

Patrícia Zancanella

**MITOTANO: METABOLISMO ENANTIOSELETIVO,
ENCAPSULAÇÃO EM LIPOSSOMAS E AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN*
*VIVO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira

**CURITIBA
2008**

Dedicatória

Dedico esse trabalho à minha família, razão da
minha vida.

Agradecimentos

Esta é a seção mais valiosa (e também mais satisfatória) deste trabalho, pois é o momento de reconhecer o mais importante legado desta caminhada, a bênção de contar com pessoas que, de perto ou à distância, constante ou intermitentemente, participaram não apenas com sua contribuição, seu trabalho, boa vontade, olhar crítico, opinião, revisão, ou com equipamentos, reagentes e estrutura física, mas com seu ombro amigo, seu jeito único, seu carinho e a deliciosa convivência cotidiana.

Apesar de valiosa e satisfatória, a elaboração dos Agradecimentos é uma tarefa árdua. Apesar dos riscos de cometer injustiças ou de não expressar minha gratidão a contento, tentarei me lembrar de cada pessoa que iluminou esta caminhada.

Agradeço à minha família, que é uma fonte inesgotável de estímulo, apoio e amor. É impossível dimensionar minha gratidão a vocês, papai, mamãe e irmãozinho. Essa “equipe de peso” foi recentemente complementada com o Túlio, marido querido, que participou desse projeto de todas as maneiras, possíveis e impossíveis, auxiliando nos experimentos com animais, sendo ótima companhia nos finais de semana de experimentos e nas noites prolongadas e, ainda, mantendo a harmonia e a ordem da nossa casa, confortando, compreendendo e estimulando. Um companheiro incomparável...

Ao Professor Brás, por acompanhar meus passos desde 2004, pela caprichosa revisão da qualificação e tese e pela dedicação na elaboração e revisão das publicações.

À Professora Maria Helena, que me recebeu da melhor maneira possível. Sua energia e sua dedicação são inspiradoras.

Ao Professor Cesar, pelas valiosas contribuições nos trabalhos com os enantiômeros e por nos oferecer livre acesso ao laboratório e equipamentos.

Ao Professor Bonald, pelo auxílio nos experimentos com animais. Aos amigos do CEGEMPAC, Renato, Elis, Dona Glaci.

À Professora Sônia, agradeço pela constante e imediata disponibilidade em ajudar, apesar de todos os alunos para atender e quaisquer outros compromissos. Sônia, você é um exemplo de boa vontade e carinho. Seu apoio constante foi crucial.

À Professora Letícia, ao Professor Patricio e ao Professor Ronilson, pelos questionamentos pertinentes e pelas sábias correções, sugestões e ensinamentos.

À Professora Jaísa, pelo exemplo de justiça e retidão e pelo constante apoio e disposição para auxiliar.

Amiga Patricia Severino, sou grata por sua dedicação, constante disponibilidade em ajudar, hospitalidade, generosidade, carinho e amizade. Feliz de quem tem a sorte de encontrar alguém como você! Não há palavras adequadas ou suficientes para expressar minha gratidão.

Caco, agradeço por me acompanhar desde os primeiros experimentos, pelo carinho e por sua amizade.

Aos amigos do laboratório da Professora Maria Helena e do laboratório do Professor Cesar, que me receberam de braços abertos: Gilson, Bia, André, Luciana, Thaís, Fernando, Amós, Amaro, Alessandra, João Paulo, Daniel, Fernando, Patricia S. Em especial, agradeço à Giuliana, pelo auxílio nos planos referentes à inclusão do mitotano nas formulações por ela desenvolvidas.

No laboratório do Professor Brás, eu não poderia estar mais bem acompanhada. Meus amigos Elisa, Alexandre, Janaína, Cesar, Júlio, Daniela, Karina, Aline, Denise, Claudenize, Maurício, Joy, sou grata por cada dia que compartilhamos, por seu apoio, carinho, companheirismo e ombro amigo. Pequena Elisa, você mora no meu coração. Aos queridos amigos Tati e Ceará, por alegrar alguns de nossos dias no laboratório.

Agradeço à pronta disponibilidade em ajudar do Daniel, Silvana e Jorgete, do Lacen. Daniel, a você quero tecer agradecimentos irrestritos.

Ao Rafael Martinelli, que tem acompanhado e contribuído com a minha caminhada desde 2005. Agradeço imensamente por respeitar meu ritmo tornando minhas atividades e meus horários flexíveis, por respeitar minha grande vontade de aprender e por me oferecer tantas oportunidades de aprendizado. Conviver com você é uma excelente oportunidade de aprendizado. Agradeço, também, por compreender as extensões das várias viagens a São Paulo e a Campinas, das quais obtive enorme proveito e tornaram viáveis capítulos importantes deste trabalho.

Ao Paulo (Farago), exemplo de persistência e humildade. À Juliana (Kloss), pelo enorme auxílio na realização dos difratogramas de raio-X.

À Professora Carmen, do Departamento de Bioquímica, por prontamente permitir o uso do polarímetro.

Ao Professor Aguinaldo, pelas análises estatísticas.

À amiga e Professora Maria Suely, por me encantar pela pesquisa, pelos desafios e pelo aprendizado ainda na época da graduação. Você tem enorme responsabilidade pelo que sou hoje!

Ao Felipe Barbosa, por ter sido “minha mão direita” enquanto ela não estava em perfeitas condições de uso. Agradeço por sua constante boa vontade.

Meus sinceros agradecimentos ao Cândido e ao Luís, do Biotério da UFPR, que fizeram pequenos e vários milagres para nos auxiliar com os animais.

A todos que, direta ou indiretamente tornaram esse percurso mais agradável e menos difícil e contribuíram com a minha formação pessoal, acadêmica, profissional e espiritual.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CAC: carcinoma adrenocortical

CD: ciclodextrina

γ -CD: gama ciclodextrina

CG-CE: cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

FDA: *Food and Drug Administration*

DDT: triclorodifenil-tricloroetano

DP: desvio padrão

MEV: microscopia eletrônica de varredura

o,p-DDD: o,p'-diclorodifenildicloroetano ou mitotano

QELS: método *quasi-elastic light scattering*, empregado na espectroscopia de espalhamento de luz de alta frequência

SPC-3: fosfolípidios obtidos da fosfatidilcolina de soja

TC 199: tampão usado com meio de incubação para manter a viabilidade dos segmentos intestinais dos ratos

TCM: dieta enteral Trigliceril CM[®], composta por triglicerídeos de cadeia média (TCM)

UV: ultravioleta

Sumário

| | |
|--|------------|
| DEDICATÓRIA..... | I |
| AGRADECIMENTOS..... | II |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... | V |
| SUMÁRIO | VI |
| LISTA DE FIGURAS | IX |
| LISTA DE TABELAS | XI |
| RESUMO | XII |
| ABSTRACT | XIV |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 3 |
| 2.1 CARCINOMA ADRENOCORTICAL | 3 |
| 2.2 MITOTANO | 7 |
| 2.2.1 ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS E RELAÇÃO COM A BIODISPONIBILIDADE | 7 |
| 2.2.2 MECANISMO DE AÇÃO DO MITOTANO | 9 |
| 2.2.3 METABOLISMO DO MITOTANO EM HUMANOS | 10 |
| 2.2.4 METABOLISMO DO MITOTANO EM ANIMAIS | 11 |
| 2.2.5 RELAÇÃO ENTRE QUIRALIDADE E FARMACOCINÉTICA..... | 12 |
| 2.2.6 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO MITOTANO | 15 |
| 2.3 LIPOSSOMAS NA ENCAPSULAÇÃO DE ATIVOS..... | 19 |
| 2.4 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DE FORMULAÇÕES DE MEDICAMENTOS | 22 |
| 2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS | 23 |
| 3 OBJETIVOS..... | 26 |
| OBJETIVO GERAL..... | 26 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 26 |
| 4 EXPERIMENTAL | 27 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.1 | ESPECIFICAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS, MATERIAIS, REAGENTES E SOLVENTES.. | 27 |
| 4.1.1 | EQUIPAMENTOS E MATERIAIS | 27 |
| 4.1.2 | REAGENTES E SOLVENTES | 28 |
| 4.2 | DETERMINAÇÃO QUIRAL DO MITOTANO EM PLASMA..... | 28 |
| 4.2.1 | SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS EM CLAE QUIRAL | 28 |
| 3.2.2 | COMPOSIÇÃO ENANTIOMÉRICA EM PLASMA DE PACIENTES | 30 |
| 4.3 | ENCAPSULAÇÃO DO MITOTANO EM LIPOSSOMAS | 30 |
| 4.3.1 | OBTENÇÃO DAS PARTÍCULAS FOSFOLIPÍDICAS SECAS | 31 |
| 4.3.2 | CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS FOSFOLIPÍDICAS SECAS | 32 |
| 4.3.3 | OBTENÇÃO DE LIPOSSOMAS | 33 |
| 4.3.4 | CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS..... | 34 |
| 4.4 | ESTUDO COMPARATIVO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL DO MITOTANO..... | 37 |
| 4.4.1 | CONCENTRAÇÃO DE MITOTANO NOS COMPARTIMENTOS | 39 |
| 4.4.2 | PERMEABILIDADE INTESTINAL PARA OS ENANTIÔMEROS DO MITOTANO | 39 |
| 4.5 | CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DO MITOTANO APÓS ADMINISTRAÇÃO ORAL CRÔNICA EM RATOS | 40 |
| 4.5.1 | DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO (CG-CE) | 40 |
| 4.5.2 | AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE RELATIVA..... | 42 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 44 |
| 5.1 | DETERMINAÇÃO QUIRAL DO MITOTANO EM PLASMA..... | 44 |
| 5.2 | ENCAPSULAÇÃO DO MITOTANO EM LIPOSSOMAS | 52 |
| 5.2.1 | OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS FOSFOLIPÍDICAS SECAS | 53 |
| 5.2.2 | OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS..... | 60 |
| 5.3 | ESTUDO COMPARATIVO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL DO MITOTANO..... | 65 |
| 5.3.1 | CONCENTRAÇÃO DE MITOTANO NOS COMPARTIMENTOS | 65 |
| 5.3.2 | PERMEABILIDADE INTESTINAL PARA OS ENANTIÔMEROS DO MITOTANO | 69 |
| 5.4 | CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DO MITOTANO APÓS ADMINISTRAÇÃO ORAL CRÔNICA EM RATOS | 70 |
| 5.4.1 | EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE) | 70 |
| 5.4.2 | CURVA ANALÍTICA, LINEARIDADE E EFEITO DA MATRIZ | 75 |
| 5.4.3 | ESPECIFICIDADE | 77 |
| 5.4.4 | PRECISÃO, EXATIDÃO E RECUPERAÇÃO | 78 |
| 5.4.5 | AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE RELATIVA..... | 79 |
| 6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES | 82 |
| 6.1 | CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES | 82 |
| 6.2 | RECOMENDAÇÕES PARA FUTUROS TRABALHOS | 83 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 85 |
| 8 | ANEXOS | 94 |

| | |
|---|-----------|
| 8.1 CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO HOSPITAL ERASTO GAERTNER, LIGA PARANAENSE DE COMBATE AO CÂNCER..... | 95 |
| 8.2 CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DO SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UFPR..... | 96 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DO MITOTANO | 5 |
| FIGURA 2 – CLASSES BIOFARMACÊUTICAS DOS FÁRMACOS, DE ACORDO COM A SOLUBILIDADE E A PERMEABILIDADE..... | 8 |
| FIGURA 3 - INTERMEDIÁRIOS DO METABOLISMO DO MITOTANO IDENTIFICADOS EM URINA DE HUMANOS | 11 |
| FIGURA 4 - INTERMEDIÁRIOS DO METABOLISMO DO MITOTANO IDENTIFICADOS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE ANIMAIS..... | 11 |
| FIGURA 5 – ESTRUTURA DOS ENANTIÔMEROS (R) E (S) DO MITOTANO | 14 |
| FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DA MOLÉCULA DA γ -CICLODEXTRINA..... | 16 |
| FIGURA 7 – FORMAÇÃO DE BICAMADAS E LIPOSSOMAS DE FOSFOLIPÍDIOS | 20 |
| FIGURA 8 – OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES | 30 |
| FIGURA 9 – FOSFATIDILCOLINA DE SOJA UTILIZADA COMO CONSTITUINTE ESTRUTURAL NAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS..... | 32 |
| FIGURA 10 – QUANTIFICAÇÃO DE FOSFATO NAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS | 35 |
| FIGURA 11 – GRADIENTES DE SACAROSE PARA A SEPARAÇÃO DO MITOTANO NÃO ENCAPSULADO | 36 |
| FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO TESTE DO INTESTINO INVERTIDO | 38 |
| FIGURA 13 – OBTENÇÃO DO EXTRATO DO PLASMA E POSTERIOR PREPARO DOS PONTOS DA CURVA ANALÍTICA..... | 41 |
| FIGURA 14 – CROMATOGRAMA DE PLASMA FORTIFICADO COM MITOTANO RACÊMICO | 46 |
| FIGURA 15 – CROMATOGRAMA OBTIDOS COM OS ENANTIÔMEROS DO MITOTANO SEPARADOS | 46 |
| FIGURA 16 – ORDEM DE ELUIÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO MITOTANO E DESVIO DO PLANO DA LUZ POLARIZADA..... | 47 |
| FIGURA 17 – CROMATOGRAMA EM CLAE UTILIZANDO γ -CD: RESOLUÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO MITOTANO EM PLASMA DE PACIENTE PEDIÁTRICO | 48 |
| FIGURA 18 – EXCESSO ENANTIOMÉRICO MÉDIO PARA O (R)-(+)-MITOTANO NO PLASMA DOS PACIENTES EM TRATAMENTO COM A MISTURA RACÊMICA..... | 50 |
| FIGURA 19 – GRÁFICOS DE DISPERSÃO PARA O EXCESSO ENANTIOMÉRICO DO (R)-(+)-MITOTANO PARA O PACIENTE # 1..... | 51 |
| FIGURA 20 – HIPOTÉTICA ROTA METABÓLICA DOS ENANTIÔMEROS DO MITOTANO LEVANDO AOS DOIS PRINCIPAIS METABÓLITOS ENCONTRADOS EM HUMANOS..... | 52 |
| FIGURA 21 – MORFOLOGIA DO MITOTANO POR MEV | 56 |
| FIGURA 22 – DIFRATOGRAMA DO MITOTANO, DO MANITOL E DO FOSFOLIPÍDIO..... | 56 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 23 – MORFOLOGIA DAS PARTÍCULAS SECAS DAS FORMULAÇÕES DO GRUPO A | 57 |
| FIGURA 24 – DIFRATOGRAMAS DAS FORMULAÇÕES DO GRUPO A | 57 |
| FIGURA 25 – MORFOLOGIA DAS PARTÍCULAS SECAS DAS FORMULAÇÕES DO GRUPO B..... | 58 |
| FIGURA 26 – DIFRATOGRAMAS DAS FORMULAÇÕES DO GRUPO B..... | 58 |
| FIGURA 27 – MORFOLOGIA DAS PARTÍCULAS SECAS DAS FORMULAÇÕES DO GRUPO C..... | 59 |
| FIGURA 28 – DIFRATOGRAMAS DAS FORMULAÇÕES DO GRUPO C..... | 59 |
| FIGURA 29 – MEIO INTERNO: PERMEAÇÃO DO MITOTANO NAS DIFERENTES FORMULAÇÕES..... | 67 |
| FIGURA 30 – SEGMENTO DUODENAL: CONCENTRAÇÃO DE MITOTANO ... | 68 |
| FIGURA 31 – MEIO EXTERNO: CONCENTRAÇÃO DE MITOTANO | 68 |
| FIGURA 32 – CROMATOGRAMA DE CG-CE OBTIDO DURANTE O TESTE DO MÉTODO 2 DA TABELA 14 | 73 |
| FIGURA 33 – CROMATOGRAMA DE CG-CE OBTIDO UTILIZANDO AS CONDIÇÕES PADRONIZADAS PARA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA..... | 75 |
| FIGURA 34 – CURVA ANALÍTICA DO MITOTANO EM HEXANO..... | 76 |
| FIGURA 35 – CURVA ANALÍTICA DO MITOTANO NO EXTRATO DO PLASMA | 76 |
| FIGURA 36 – COMPARAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS DO MITOTANO, EM HEXANO E EM EXTRATO DE PLASMA, PARA INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA MATRIZ..... | 77 |
| FIGURA 37 – CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE MITOTANO, NAS TRÊS DIFERENTES FORMULAÇÕES, DURANTE TRATAMENTO CRÔNICO | 79 |
| FIGURA 38 – CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE MITOTANO EM % DO TOTAL ADMINISTRADO, NAS TRÊS DIFERENTES FORMULAÇÕES, DURANTE TRATAMENTO CRÔNICO | 80 |

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DO CAC EM ESTÁDIOS E TRATAMENTO INDICADO | 4 |
| TABELA 2 – DIFERENÇAS FARMACOCINÉTICAS E FARMACODINÂMICAS DE ALGUNS FÁRMACOS QUIRAIS | 13 |
| TABELA 3 – CONFIGURAÇÃO RELATIVA E ABSOLUTA DO o,p-DDD e o,p-DDT | 17 |
| TABELA 4 – PLANEJAMENTO MULTIFATORIAL DE EXPERIMENTOS FRACIONADO: 2^{4-1} | 29 |
| TABELA 5 – COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES, VAZÃO DE ALIMENTAÇÃO NO SECADOR E CONDIÇÕES OPERACIONAIS | 31 |
| TABELA 6 – PLANEJAMENTO FATORIAL PARA DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO MITOTANO EM PLASMA HUMANO | 45 |
| TABELA 7 – RESULTADOS DA ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM FASE QUIRAL DO PLASMA DE PACIENTES | 49 |
| TABELA 8 – RENDIMENTO NA OBTENÇÃO DAS PARTÍCULAS FOSFOLIPÍDICAS SÓLIDAS | 54 |
| TABELA 9 – DIÂMETRO HIDRODINÂMICO MÉDIO E DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS FORMULAÇÕES | 60 |
| TABELA 10 – CONCENTRAÇÃO DE FOSFATO NAS FORMULAÇÕES, ANTES E APÓS A SECAGEM POR ATOMIZAÇÃO | 62 |
| TABELA 11 – DETERMINAÇÃO INDIRETA DA CONCENTRAÇÃO DE MITOTANO E RELAÇÃO MOLAR FOSFOLIPÍDIO/MITOTANO | 63 |
| TABELA 12 – GRADIENTE DE SACAROSE PARA SEPARAÇÃO DO MITOTANO NÃO ENCAPSULADO | 64 |
| TABELA 13 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA TÍPICA DO FLORISIL | 71 |
| TABELA 14 – MÉTODOS TESTADOS NA OTIMIZAÇÃO DA LIMPEZA DO EXTRATO DO PLASMA ATRAVÉS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA, PARA ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA | 72 |
| TABELA 15 – TESTES PARA REDUÇÃO DA MASSA DE FLORISIL NECESSÁRIA PARA LIMPEZA DO EXTRATO DO PLASMA ATRAVÉS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA | 74 |
| TABELA 16 – DETERMINAÇÃO DA EXATIDÃO E PRECISÃO DO MÉTODO DE CG-CE PARA QUANTIFICAÇÃO DE MITOTANO EM PLASMA DE RATOS | 78 |

Resumo

O carcinoma adrenocortical (CAC) em crianças, no Sul do Brasil, apresenta uma incidência cerca de 10 vezes maior do que nos EUA, e está associado a uma sobrevida em 5 anos de apenas 10 %, quando diagnosticado em estádios avançados (III ou IV). Apesar de ser o único medicamento específico indicado para o tratamento do CAC, o mitotano (o,p'-diclorodifenildicloroetano) possui difícil manejo devido às altas doses recomendadas, associadas à baixa solubilidade em água e baixa biodisponibilidade; à severidade e frequência dos efeitos tóxicos; ao número diário de comprimidos a ser ingerido por via oral, aliado ao tamanho dos comprimidos e, conseqüentemente, à dificuldade de adesão dos pacientes, especialmente pediátricos. Na tentativa de reduzir as limitações associadas à solubilidade da substância ativa, foram desenvolvidas e caracterizadas oito formulações lipossomais encapsulando o mitotano. Dentre as formulações lipossomais propostas, foi escolhida a opção com maior proporção molar fosfolipídio/mitotano (3,34:1), 100 % de eficiência de encapsulação da substância ativa e vesículas com diâmetro da ordem de 1 μ m, para avaliações comparando com formulações convencionais (mitotano puro e mitotano misturado à dieta enteral TCM) mediante ensaio de permeação intestinal (*in vitro*) e biodisponibilidade relativa por administração crônica (*in vivo*). Para realização dos ensaios *in vitro* e *in vivo*, o mitotano na forma lipossomal foi utilizado em doses cinco vezes menores do que nas formulações convencionais. As taxas de permeação intestinal do mitotano, foram maiores para a forma lipossomal ($p < 0,05$) quando comparadas às formulações convencionais. Na administração crônica aos ratos, a formulação lipossomal gerou concentrações plasmáticas menores, quando comparada com as formulações convencionais ($p < 0,05$). Entretanto, quando a concentração do mitotano no plasma foi representada como porcentagem da concentração total administrada, a formulação lipossomal apresentou maiores concentrações de mitotano do que as formulações convencionais ($p < 0,05$). A formulação lipossomal desenvolvida e submetida aos ensaios *in vitro* e *in vivo* mostra-se promissora, com possibilidade de utilização de doses menores, melhor aproveitamento das doses administradas e, provavelmente, redução dos efeitos adversos. Além das considerações relacionadas à administração do mitotano, merece destaque a presença de um centro assimétrico, indicando a existência de um par de enantiômeros, já que os processos farmacocinéticos podem atuar com discriminação quiral, seja na absorção, distribuição, metabolismo ou excreção. Segundo a literatura científica, o metabolismo de drogas com centros quirais é responsável por grande parte da estereosseletividade na farmacocinética e biodisponibilidade de fármacos, resultando em concentrações diferentes dos dois enantiômeros ao longo do tempo. Para investigar a possível absorção diferencial dos enantiômeros, amostras do ensaio de permeação intestinal em ratos (*in vitro*), realizado com a mistura racêmica da substância ativa, foram analisadas quanto à composição enantiomérica em cromatografia líquida de alta eficiência quiral, tendo sido identificados os enantiômeros (+) e (-) em iguais proporções. Para avaliar a possibilidade de metabolismo estereo-seletivo dos enantiômeros, a proporção entre eles foi investigada no plasma de cinco pacientes pediátricos em tratamento com o mitotano, administrado na forma de mistura racêmica. Para as amostras dos cinco pacientes, o (R)-(+)-mitotano foi identificado em maiores

proporções, sugerindo que o (S)-(-)-mitotano é mais metabolizado. Com base nestas determinações, postula-se a existência de caminhos metabólicos diferenciais para os enantiômeros do mitotano, em condições idênticas. Merecem investigação possíveis diferenças terapêuticas e tóxicas entre os enantiômeros do mitotano.

Abstract

The adrenocortical carcinoma (ACC) among children of the South of Brazil has an incidence 10 – 15 times higher than at EUA and it is associated to 10 % survival (5 years) for stages III and IV diseases. Mitotane is the only specific drug to treat ACC, but it is difficult to deal with in face of the high recommended doses, poor water solubility, poor bioavailability, adverse events severity and frequency, number of daily pills taken by oral route and the pills big size. All these factors turn its use very difficult for patients, especially children. In order to overcome troubles related to poor solubility, eight liposomal forms were developed. Among the liposomal form, it was chosen the one containing a higher phospholipid/mitotane molar proportion (3,34:1), 100 % encapsulation efficiency and vesicles which diameter is around 1 μm to be tested by intestinal permeability (in vitro test) and comparative bioavailability (in vivo test). For in vitro and in vivo test, the liposomal form used mitotane concentration five times smaller than the standard forms. The permeation levels were higher for liposomal than conventional form ($p < 0,05$). When the forms were chronically delivered to mouse by intragastric intubation, the liposomal form showed smaller plasma levels than conventional forms ($p < 0,05$). Nevertheless when plasma levels were expressed as percentage of the total dose delivered, the liposomal form showed higher plasma levels than standards forms ($p < 0,05$). The liposomal form developed here and analyzed by in vitro and in vivo test is promising, turning smaller doses possible, that may be better used by the organism and, probably, reduce adverse events. Besides the troubles related to mitotane administration, it's important to highlight the assymetric centre at mitotane molecular structure, determining a pair of enantiomers existence, especially because pharmacokinetics processes can discriminate between chiral forms during absorption, distribution, metabolism or excretion. According to scientific literature, the enantioselective metabolism is responsible for most of stereo-selective pharmacokinetic and bioavailability for drugs, leading to enantiomers different levels during the time. In order to investigate the possibility of differential mitotane enantiomers absorption, samples from intestinal permeability, that used mitotane racemic mixture, were evaluated regarding the enantiomeric composition by chiral high performance liquid chromatography. It identified the presence of both mitotane enantiomers, (+) and (-), at similar proportions. In order to investigate the stereo-selective metabolism, the proportion between mitotane enantiomers was determined at plasma samples taken from 5 children treated for ACC by mitotane (racemic mixture). At all samples from 5 children (R)-(+)-mitotane was identified at higher proportions, suggesting the (S)-(-)-is more extensively metabolized. Regarding these findings, it is postulated the existence of different metabolic routes for mitotane enantiomers, at identical conditions. Possible therapeutic and toxic differences among mitotane enantiomers should be explored.

1 Introdução

O mitotano é um medicamento indicado exclusivamente para o tratamento dos casos avançados do carcinoma adrenocortical (CAC). O CAC em crianças, no Sul do Brasil, apresenta uma incidência cerca de 10 vezes maior do que nos EUA, e está associado a uma sobrevida em 5 anos de apenas 10 %, quando diagnosticado em estadios avançados (III ou IV). As glândulas adrenais são responsáveis pela biossíntese de hormônios da classe dos mineralocorticóides, glicocorticóides e andrógenos. Na maioria dos casos, o CAC provoca excessos nas vias biossintéticas dos mineralocorticóides, glicocorticóides ou andrógenos e precursores de estrógenos, o que conduz a manifestações clínicas distintas. A virilização é causada pelo excesso de andrógenos (testosterona) e seus precursores. A síndrome de Cushing, causada pelo excesso de cortisol, é caracterizada por obesidade, faces em lua cheia, estrias, retardo na taxa de crescimento, hirsutismo generalizado, obesidade de tronco e, menos frequentemente, hipertensão e comprometimento do metabolismo da glicose. A feminização ocorre quando há produção excessiva de estrógenos, particularmente estradiol. Os sinais e os sintomas da feminização são desenvolvimento sexual precoce, crescimento acelerado, idade óssea avançada e sangramentos vaginais.

Apesar de ser o único medicamento específico aprovado pelo FDA para o tratamento do CAC, a utilização do mitotano é difícil, especialmente devido à baixa solubilidade em água e conseqüente baixa biodisponibilidade; às altas doses recomendadas para ingestão crônica por via oral; aos grandes comprimidos contendo 500 mg da substância ativa, exigindo a ingestão de até 20 comprimidos por dia; à frequência e à severidade das reações adversas, já que o mitotano é análogo do inseticida diclorodifeniltricloroetano (DDT). Os relatos da literatura indicam claramente que o mitotano exerce sua ação anti-tumoral em concentrações plasmáticas entre 14 e 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Estas características tornam muito difícil, e por vezes até impossível, para o paciente pediátrico manter a adesão ao tratamento. Uma informação cujo impacto ainda não foi elucidado é a presença, no mitotano, de um centro assimétrico, indicando sua existência como um par de enantiômeros.

Em busca de minimizar as limitações impostas pela baixa solubilidade, baixa biodisponibilidade, reações adversas e grandes dimensões dos comprimidos, e para reduzir o tempo de tratamento necessário à obtenção das concentrações plasmáticas consideradas terapêuticas, este trabalho desenvolve formulações lipossomais encapsulando o mitotano, que são comparativamente avaliadas com as formulações convencionais em estudos de permeação intestinal (*in vitro*) e de biodisponibilidade relativa (*in vivo*). Para tanto, foram desenvolvidos, padronizados e validados os métodos bioanalíticos para quantificação do mitotano. Deve-se ressaltar que não há, até o momento, relatos de formulações lipossomais encapsulando o mitotano.

Para investigar as prováveis diferenças na farmacocinética e farmacodinâmica dos enantiômeros do mitotano, este trabalho determinou a proporção dos enantiômeros do mitotano no plasma de pacientes pediátricos, utilizando CLAE quiral. Na mesma linha de raciocínio, foi investigada a seletividade quiral na permeação através de segmentos intestinais. Até o momento, os relatos da literatura estudam os enantiômeros do mitotano apenas em amostras ambientais, devido à sua relação com o inseticida DDT.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Carcinoma adrenocortical

O carcinoma adrenocortical (CAC) é uma neoplasia maligna que acomete o córtex das glândulas adrenais, atingindo, anualmente, 0,3 crianças por milhão de crianças até 15 anos (PIANOVSKI et al, 2006). No sul do Brasil, a incidência do CAC em pediatria é singular, sendo de 10 a 15 vezes maior do que nos Estados Unidos e Europa, vitimando de 2,9 a 4,2 novos casos por milhão de crianças. Este aumento de casos no sul do Brasil está associado a uma mutação hereditária do gene *Tp53* (R337H), detectada em todas as crianças acometidas pelo CAC (PIANOVSKI et al, 2006). Apesar desta forte associação entre a mutação do gene *Tp53* e o CAC, não são encontradas, na literatura científica, explicações para o surgimento de tal mutação e para a incidência singular no sul do Brasil. O CAC possui um prognóstico pobre, com uma taxa de sobrevida 5 anos após o diagnóstico de 40 % (TERZOLO e BERRUTI, 2008). A presença de metástase reduz a sobrevida em 5 anos para menos do que 10 % (BARLASKAR e HAMMER, 2007).

As glândulas adrenais, localizadas nos pólos superiores dos rins, são divididas anatomicamente em córtex e medula e são recobertas por uma cápsula. As adrenais são responsáveis pela biossíntese de hormônios esteróides da classe dos glicocorticóides, mineralocorticóides e precursores dos hormônios sexuais, que levam ao desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários na adolescência. O principal representante dos glicocorticóides é o cortisol, hormônio essencial à vida, tendo ação sobre praticamente todos os sistemas do organismo. O principal representante dos mineralocorticóides é a aldosterona, cuja função primordial é manter o equilíbrio hidroeletrolítico, com efeitos diretos sobre a pressão arterial (ORTH et al., 1992).

Uma das características mais importantes das neoplasias malignas é o crescimento desenfreado e desorganizado de células, o que provoca um aumento do tamanho e da funcionalidade do órgão ou do tecido acometido. A hiperplasia e a hiperfuncionalidade das glândulas adrenais no CAC podem causar excessos na biossíntese dos mineralocorticóides, glicocorticóides ou andrógenos e precursores de

estrógenos, o que conduz a quatro síndromes clínicas distintas, a virilização, a Síndrome de Cushing, uma forma mista (geralmente associação de virilização e Cushing) e ainda a ausência de excessos hormonais, quando se observa apenas um efeito de massa (tumor palpável) (KOPF et al., 2001).

O tratamento das neoplasias malignas é estabelecido em função do tamanho do tumor no local de surgimento (sítio primário), presença de tumor em linfonodos (circulação linfática) e grau de acometimento de outros órgãos e tecidos (metástase), o que é expresso através da classificação em estádios. As opções terapêuticas do CAC em função do estadiamento estão descritas na Tabela 1.

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DO CAC EM ESTÁDIOS E TRATAMENTO INDICADO

| ESTADIO | DESCRIÇÃO | TRATAMENTO INDICADO |
|---------|--|---|
| I | Tumor pesando menos que 200 g, que tenha sido totalmente retirado através de cirurgia; ausência de metástase | Cirurgia para retirada do tumor |
| II | Tumor pesando mais que 200 g, que tenha sido totalmente retirado através de cirurgia; ausência de metástase | Cirurgia, com retirada de linfonodos retroperitoneais |
| III | Tumor residual ou que não pode ser retirado através de cirurgia (excessivamente grande) | Cirurgia (retirada de linfonodos retroperitoneais) associada a mitotano e antineoplásicos (C, E, D) |
| IV | Metástase | |

FONTE: SANDRINI et al., 1997; MICHALKIEWICZ et al., 2004; RIBEIRO e FIGUEIREDO, 2004
NOTAS: C – cisplatina; E – etoposida; D – doxorubicina.

O tratamento de primeira escolha e com maiores chances de prolongar a sobrevida livre de doença é a retirada do tumor através de cirurgia, sendo esta a única opção potencialmente curativa (POMMIER e BRENNAN, 1992; SCHULICK e BRENNAN, 1999; TERZOLO e BERRUTI, 2008). Nos casos de CAC em que a ressecção cirúrgica completa não é possível (estádios III e IV), está indicado o uso de **mitotano** (o,p'-diclorodifenildicloroetano; o,p-DDD ou, segundo a IUPAC, 1-cloro-2-[2,2-dicloro-1-(4-clorofenil)-etil]-benzeno) (Figura 1), associado a outros antineoplásicos (WOOTEN et al., 1993; LIM et al., 1990; BERRUTI et al., 1998;

KASPERLIK-ZALUSKA, 2000; SCHTEINGART, 2000; BARLASKAR e HAMMER, 2007; GONZALEZ et al., 2007).

O mitotano é o único medicamento aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA, EUA) para o tratamento do CAC (PHAN, 2007). Ele tem sido bastante estudado em adultos, mas o relato de estudos clínicos com crianças é reduzido. ZANCANELLA et al. (2006) administraram mitotano (4 g.m^{-2}), por via oral, a 11 crianças, com idade entre 2 e 11,2 anos, acometidos por carcinoma adrenocortical estadio III ou IV (doença avançada), associado a oito ciclos de doxorrubicina (via endovenosa, 20 g.m^{-2}), etoposida (via endovenosa, 100 g.m^{-2}) e cisplatina (via endovenosa, 40 g.m^{-2}), com redução total ou parcial do tumor em 15 - 25% dos pacientes.

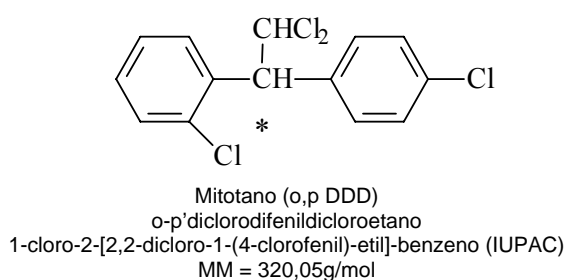


FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DO MITOTANO

Atualmente, um estudo clínico prospectivo, randomizado, multicêntrico, controlado, de fase II (avaliação de segurança e eficácia), está sendo conduzido com pacientes com carcinoma adrenocortical metastático, para comparação das respostas terapêuticas obtidas com dois esquemas: (1) cisplatino, etoposida e doxorrubicina, associados ao mitotano e (2) estreptozocina associada ao mitotano. O protocolo prevê a inclusão de 300 pacientes com idade superior a 18 anos, 150 em cada braço de estudo (COLLABORATIVE GROUP FOR ADRENOCORTICAL CARCINOMA THERAPY, 2004). Outros trabalhos sobre o tratamento do carcinoma adrenocortical utilizando mitotano (associado aos antineoplásicos) foram recentemente publicados, entretanto, da mesma forma que o estudo clínico de fase II, relatam experiências apenas com pacientes adultos (VAN DITZHUIJSEN et al., 2007; LIBÉ et al., 2007; ABIVEN et al., 2006; BERRUTI et al., 2005).

O mitotano (Lisodren) é produzido pela *Bristol-Myers Squibb* na forma de comprimidos contendo 500 mg do fármaco. O fabricante recomenda, sem especificar a idade do paciente, que o tratamento seja iniciado com doses de 2 a 6 g.dia⁻¹, divididas em 3 a 4 tomadas, elevando até 9 a 10 g.dia⁻¹, dependendo da resposta clínica e dos efeitos adversos (HUTCHISON, 2004). Estas doses causam reações adversas gastrointestinais (anorexia, náuseas, vômitos e diarreia) em 80 % dos pacientes e toxicidades neurológicas (depressão do sistema nervoso central, tontura, vertigem, cefaléia, confusão, fraqueza, labilidade emocional) em 40 % dos pacientes (HUTCHISON, 2004; BOLLEN e LANSER, 1992).

Devido à característica lipofílica, inicialmente o mitotano se acumula no tecido adiposo e aparece em baixas concentrações no sangue (TERZOLO et al., 2000). Podem ser necessários meses para a saturação da gordura, o que depende do índice de massa corpórea e do perfil metabólico de cada paciente, entre outros fatores. Após a administração oral do mitotano, 60 % da dose é absorvida e 20 a 30 % é armazenada nos tecidos, principalmente adiposo. Uma concentração plasmática máxima é obtida em 3 a 5 horas e um equilíbrio do mitotano no plasma e tecidos é alcançado no período de 12 horas. A meia-vida plasmática varia de 18 a 159 dias, com mediana de 42 a 63 dias (HUTCHISON, 2004).

O mitotano é excretado na urina, na forma metabolizada, em concentrações de 10 - 25 %, e quantidades pequenas e variáveis foram detectadas no cérebro, supra-renais, fígado, bile e soro. Não foi observado acúmulo preferencial do medicamento nas adrenais, entretanto sabe-se que o percentual de gordura é relativamente elevado no CAC. O mitotano é convertido em metabólitos solúveis em água, não sendo encontrado o fármaco inalterado na bile nem na urina (HUTCHISON, 2004). O cloreto do ácido o,p'-diclorodifenilacético (o,p'-DDA), um derivado do mitotano, é o responsável pela ação terapêutica (CAI et al., 1995).

O mitotano exerce seus efeitos na redução do volume do CAC principalmente quando as concentrações plasmáticas do fármaco são superiores a 14 µg.mL⁻¹ (VAN SLOOTEN et al., 1984; HAAK et al., 1994). As reações adversas são mais severas, mais freqüentes e mais persistentes quando as concentrações plasmáticas de mitotano ultrapassam 20 µg.mL⁻¹ (BOLLEN e LANSER, 1992). Assim, a literatura define como

terapêutica a concentração plasmática de mitotano entre 14 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Devido à severidade e à frequência das reações adversas e à relação existente entre a concentração plasmática (entre 14 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e as respostas terapêuticas, a determinação e o acompanhamento da concentração plasmática do mitotano ao longo do tratamento é muito importante (MOOLENAR et al., 1981, VAN SLOOTEN et al., 1984; HAAK et al., 1994; LUTON *et. al.*, 1990; ANDERSEN et al. 1995; DICKSTEIN et al., 1998; KHORRAM-MANESH et al., 1998; TERZOLO et al., 2000; KASPERLIK-ZALUSKA, 2000; BAUDIN et al., 2001; ABRAHAM et al., 2002).

2.2 Mitotano

2.2.1 Aspectos físico-químicos e relação com a biodisponibilidade

O mitotano é um pó branco, com fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{Cl}_4$, massa molecular de 320,05 g/mol, ponto de fusão entre 76 e 78 °C, coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) de 5,87, solubilidade de 0,1 mg/L em água (a 25 °C), sendo solúvel em etanol, isoctano, diclorometano (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2008). Ele está registrado no Chemical Abstract Service sob o número 53-19-0.

A ação terapêutica de fármacos depende da sua biodisponibilidade *in vivo* que, por sua vez, depende da permeabilidade intestinal, da solubilidade, da absorção e da dose utilizada. Reconhecendo que a dissolução da substância e a permeabilidade intestinal são os parâmetros fundamentais relacionados à taxa e à extensão da absorção, foi proposta uma classificação biofarmacêutica de substâncias ativas para correlacionar a dissolução *in vitro* com a biodisponibilidade *in vivo*. Nesta classificação, os fármacos podem ser agrupados em quatro classes biofarmacêuticas, segundo sua permeabilidade intestinal e solubilidade, conforme apresentado na Figura 2 (AMIDON, LENNERNÄS, SHAH, CRISONJ, 1995).

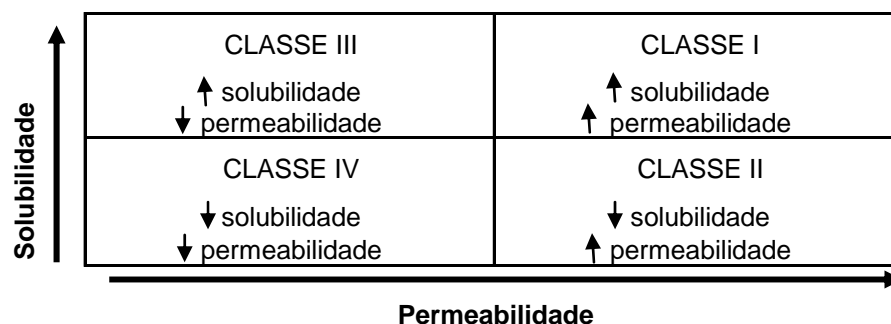


FIGURA 2 – CLASSES BIOFARMACÊUTICAS DOS FÁRMACOS, DE ACORDO COM A SOLUBILIDADE E A PERMEABILIDADE
FONTE: AMIDON, LENNERNÄS, SHAH, CRISONJ (1995)

Por definição, a solubilidade é a extensão na qual as moléculas de um sólido são removidas por um solvente. A solubilidade aquosa pode ser medida pela provável dispersão entre octanol e água (K_{ow}), e depende da habilidade para formar ligações de hidrogênio com a molécula de água (MARTINEZ, AMIDON, 2002). A solubilidade é definida como a razão dose/solubilidade, e um fármaco solúvel é definido como aquele cuja mais alta dose pretendida para humanos pode ser dissolvida em 250 mL de água (ou menos), em pH de 1 a 8 e temperatura corporal ($37 \pm 0,5$ ° C) (YU, AMIDON, POLLI, ZHAO et al, 2002).

A permeabilidade é definida como a permeabilidade real da parede do jejuno para uma substância ativa. Uma substância ativa é considerada altamente permeável quando a extensão da absorção intestinal é ≥ 90 %, geralmente não associada com instabilidade documentada no sistema gastrointestinal. Absorção intestinal inferior a 90 % é característica de substâncias pouco permeáveis (YU, AMIDON, POLLI, ZHAO et al, 2002; MARTINEZ e AMIDON, 2002).

Fármacos com baixa solubilidade em água e baixa permeabilidade, como o mitotano, apresentam vários problemas para uma administração oral efetiva, sendo a capacidade de permear as barreiras celulares a etapa limitante de sua absorção. Muitos fármacos são, reconhecidamente, potentes no tratamento de várias doenças. Porém, a otimização de seu uso é limitada pelas características de solubilidade e permeabilidade (AMIDON, LENNERNÄS, SHAH, CRISONJ, 1995).

2.2.2 Mecanismo de ação do mitotano

O mecanismo de ação do mitotano não foi completamente elucidado. Propõe-se que seja transformado em metabólito ativo, um cloreto de ácido, que se ligaria à macromoléculas das células neoplásicas do córtex adrenal (CAI et al., 1995). O mitotano exerce um efeito citotóxico direto sobre as mitocôndrias das células adrenocorticais, normais ou neoplásicas, produzindo degeneração das zonas fasciculada e reticular e atrofia celular (HART et al., 1973). Em tratamentos prolongados, foi observada destruição quase completa das células da zona fasciculada e reticular a partir do 12 ° dia de tratamento; diminuição na secreção do cortisol foi detectada dois dias após o início da terapia em cães (HUTCHISON, 2004).

Durante o uso do mitotano, pode ocorrer ausência de resposta à administração do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH); alteração do padrão do metabolismo de corticóides, com redução da excreção de 17-hidroxycorticosteróides sem diminuição concomitante no cortisol plasmático ou nas taxas de secreção de cortisol (HUTCHISON, 2004) e bloqueio da liberação de hormônios pelo tumor, com redução dos efeitos dos excessos hormonais em cerca de 75 % dos pacientes (LUTON et al., 1990; BONACCI et al., 1998; BAUDIN et al., 2001). O mitotano altera o metabolismo esteroidal periférico, com supressão do córtex adrenal e, conseqüentemente, hipocortisolismo (HUTCHISON, 2004).

Apesar da dificuldade em se relacionar doses de mitotano com respostas clínicas sem verificação e acompanhamento das concentrações plasmáticas, WAJCHENBERG et al. (2000) relataram que, em doses de até 3 g.dia⁻¹, o mitotano suprime a secreção adrenal de esteróides e, em doses superiores a 3 g.dia⁻¹, é observado um efeito citotóxico. Segundo WILLIAMSON et al. (2000), a administração crônica de mitotano, em doses superiores a 3 g.dia⁻¹, causa atrofia adrenal e necrose.

Ao exercer sua ação citotóxica sobre as mitocôndrias das células das glândulas adrenais, normais e neoplásicas, o mitotano causa insuficiência de adrenal em praticamente todos os pacientes (SCHULICK & BRENNAN, 1999). A crise aguda de insuficiência da adrenal é um quadro grave que pode rapidamente conduzir ao choque e

ao óbito. Este quadro pode se instalar em situações de estresse, como infecções, cirurgias, traumas, quando há um aumento na demanda por glicocorticóides, ou períodos de vômitos e diarreia após infusões de antineoplásicos, que comprometem a absorção da reposição hormonal oral. Para prevenir e minimizar as crises agudas, é necessária a reposição de mineralocorticóides e glicocorticóides (WAJCHENBERG et al., 2000; ABRAHAM et al. 2002; CIFCTI et al., 2001; HOGAN et al., 1978).

2.2.3 Metabolismo do mitotano em humanos

Para produzir efeitos terapêuticos, o mitotano necessita ser metabolizado (SCHTEINGART, 2000; REIF et al., 1974; CAI et al., 1995), o que ocorre especialmente no fígado e, em menor proporção, nos rins (Cancer Care Ontário, 2008). Os efeitos produzidos pelo mitotano nas espécies animais variam em função do metabolismo deste fármaco. As adrenais de cães são as mais responsivas e produzem quantidades maiores de metabólitos. Por analogia, foi postulado que os CAC reagem de maneira diferente ao mitotano, em função da habilidade em metabolizá-lo (SCHTEINGART, 2000).

A Figura 3 mostra o caminho metabólico mais provável do mitotano e os produtos intermediários do mitotano isolados e identificados em urina de humanos.

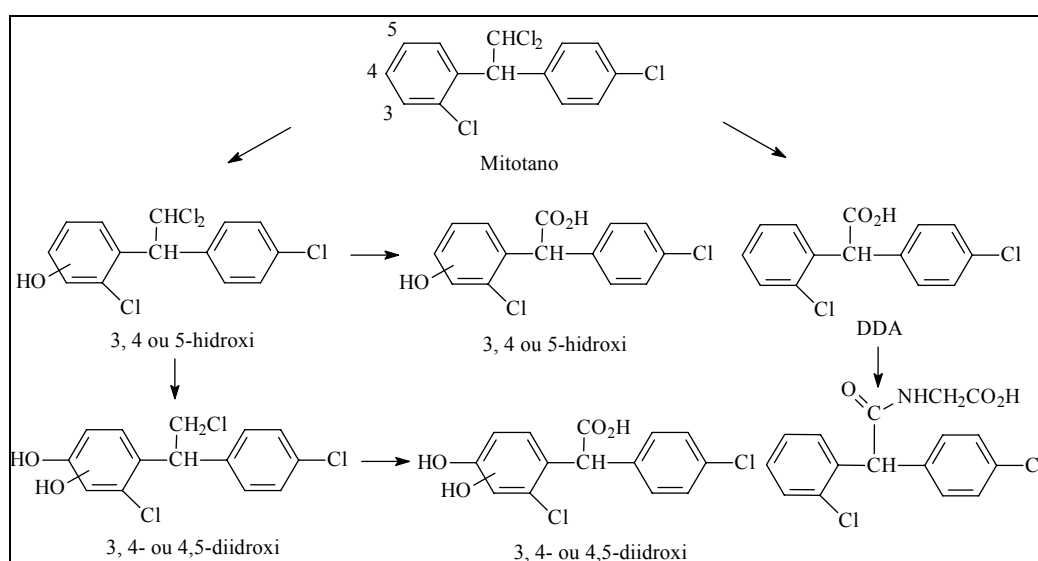


FIGURA 3 - INTERMEDIÁRIOS DO METABOLISMO DO MITOTANO IDENTIFICADOS EM URINA DE HUMANOS

FONTE: SCHTEINGART, 2000; REIF et al., 1974; CAI et al., 1995.

2.2.4 Metabolismo do mitotano em animais

Com o objetivo de identificar intermediários da via metabólica do mitotano ainda desconhecidos e considerando a variação da atividade farmacológica em diferentes espécies animais, estudos foram realizados com ratos e cobaias (REIF et al., 1975; JENSEN et al., 1987). A Figura 4 ilustra os compostos identificados na urina de ratos e cobaias e fezes de ratos.

A estrutura em vermelho na Figura 4 representa o cloreto de ácido dotado de ação farmacológica, mas este produto não foi recuperado das amostras biológicas de humanos, provavelmente devido à sua grande reatividade química com outros compostos orgânicos. É importante ressaltar que o ácido o,p'-diclorodifenilacético (o,p'-DDA) foi identificado como principal metabólito do mitotano em todos os estudos encontrados na literatura.

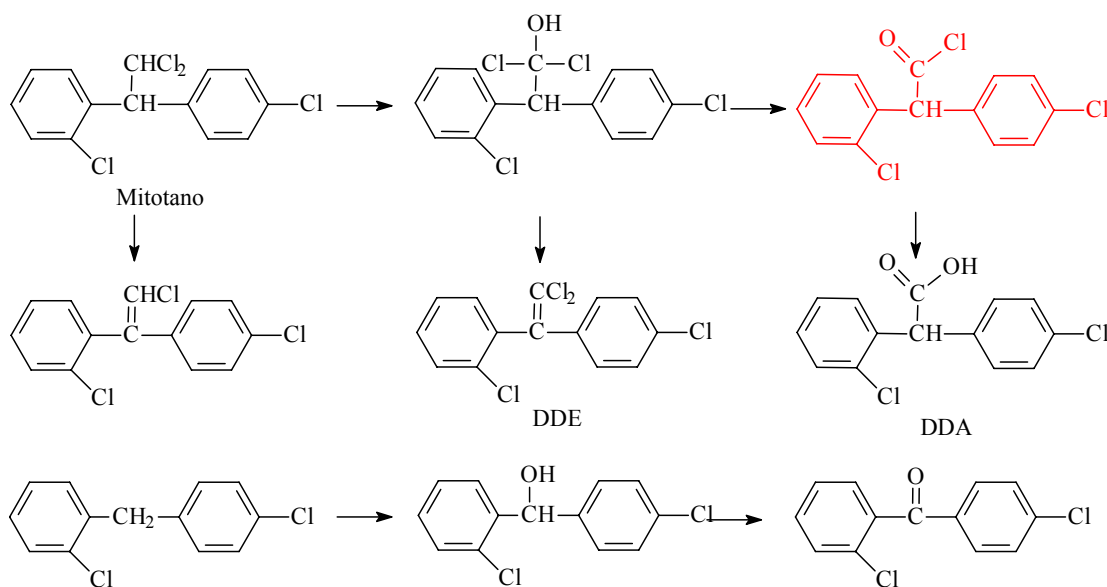


FIGURA 4 - INTERMEDIÁRIOS DO METABOLISMO DO MITOTANO IDENTIFICADOS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE ANIMAIS

FONTE: REIF et al., 1975; JENSEN et al., 1987

2.2.5 Relação entre quiralidade e farmacocinética

A atividade biológica de compostos quirais depende da sua estereoquímica, já que os organismos vivos são ambientes quirais. Está bem estabelecido que, em várias situações, a atividade farmacológica está restrita a um dos enantiômeros, enquanto o outro pode ser responsável pelas reações adversas, com diferenças significativas entre a farmacocinética e farmacodinâmica deles. Da mesma forma, a transformação biológica de compostos quirais pode ser estereoseletiva, levando à uma absorção, metabolização, excreção e, possivelmente, ação terapêutica e/ou tóxica diferenciadas (GÜBITZ e SCHMID, 2006; ALI e ABOUT-ENEIN, 2002). Um exemplo clássico é a talidomida. Enquanto o enantiômero S possui o efeito terapêutico desejado, o R foi caracterizado como teratogênico e esteve relacionado a vários defeitos físicos ao nascimento, após ter sido empregado no controle do enjôo de mulheres grávidas (REKOSKE, 2001). A estereoseletividade na farmacocinética pode ser caracterizada por medições diferentes dos dois enantiômeros para um ou mais parâmetros farmacocinéticos (LEVY, BODDY, 1991). Os enantiômeros da talidomida sofrem hidrólise espontânea e rápida interconversão quiral no pH fisiológico. Possíveis diferenças entre as ações terapêuticas e efeitos adversos do (R)-(+)-e do (S)-(-)-talidomida podem ser grandemente abolidas pela rápida interconversão *in vivo* dos enantiômeros separadamente administrados (ERIKSSON, BJÖRKMAN, ROTH, FYGE, HÖGLUND, 1995).

Exemplos de medicamentos disponíveis comercialmente como enantiômeros puros são (i) o esomeprazol magnésio, nome comercial Nexium (Astra Zeneca do Brasil), um inibidor da bomba de prótons constituído pelo isômero (S)-(-)-omeprazol; (ii) o oxalato de escitalopram, nome comercial Lexapro (Lundbeck Brasil), composto pelo isômero (S)-(+)-citalopram e utilizado no tratamento de depressão e ansiedade; (iii) o levalbuterol ou (R)-(-)-albuterol, nome comercial Xopenex (Sepracor Inc), um agonista de receptor β -2-adrenérgico utilizado como broncodilatador no tratamento de asma; (iv) o levofloxacino ou (S)-(-)-ofloxacino, um antibiótico fluorquinolona

empregado no tratamento de várias infecções, como pneumonia e infecção do trato urinário, comercializado como Levaquin pela Ortho-McNeil, como Tavanic pela Sanofi-Aventis, como Gatigol pela Alpes Selection, como Lebact pela Nicolas Piramal e como Cravit e Levox pela Daiichi. Outros exemplos são apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 – DIFERENÇAS FARMACOCINÉTICAS E FARMACODINÂMICAS DE ALGUNS FÁRMACOS QUIRAIS

| FÁRMACO QUIRAL | DIFERENÇAS FARMACOCINÉTICAS E/OU FARMACODINÂMICAS DOS ENANTIÔMEROS |
|---|---|
| Praziquantel: anti-helmíntico | A atividade anti-helmíntica é associada principalmente ao (R)-(-)-enantiômero, que também é referencialmente metabolizado |
| Varfarina: Anti-coagulante | A potência da (S)-(-)-varfarina é 2 a 5 vezes maior que a da (R)-(+)-varfarina |
| Propafenona: antiarrítmico | O (S)-(+)-enantiômero possui efeito β -bloqueador cerca de 100 vezes maior que o (R)-(-)-enantiômero (Kroemer et al., 1989). A propafenona possui metabolismo polimórfico (Kroemer et al., 1989) e com inibição competitiva no metabolismo da (S)-(+)-propafenona pela (R)-(-)- propafenona |
| Propoxifeno: analgésico e antiinflamatório | O enantiômero (+)-(2S, 3R)-propoxifeno tem propriedade analgésica, enquanto o seu isômero óptico (-)-(2R, 3S)-propoxifeno possui propriedade antitussígena |
| Ácidos 2-arilpropiónico: anti-inflamatórios não esteroidais | Alguns derivados sofrem inversão metabólica do enantiômero inativo (R)-ao enantiômero ativo (S) |

FONTE: ORLANDO et al., 2007

LU (2007) lista dezoito substâncias ativas com centro assimétrico que possuem metabolismo esteresoseletivo, entre elas a ifosfamida, o ibuprofeno, a warfarina, a fluoxetina, o omeprazol, o verapamil, o propranolol, o fenoterol e o albuterol. Acredita-se que o metabolismo enantioseletivo é responsável por grande parte da estereosseletividade na farmacocinética e biodisponibilidade de fármacos. A enantiosseletividade no metabolismo pode ocorrer de duas formas: (a) pelo metabolismo diferencial de dois enantiômeros em condições idênticas ou (b) pela formação diferencial de dois metabólitos enantioméricos a partir de uma única substância pró-quiral. Frequentemente dois enantiômeros possuem concentrações diferentes ao longo

do tempo, como resultado da discriminação quiral nos processos farmacocinéticos (LU, 2007).

Para o ibuprofeno, um anti-inflamatório, a inversão quiral é mediada pela 2-arilpropionil-coenzima A epimerase (REICHEL, BRUGGER, BANG, GEISSLINGER, BRUNE, 1997). Para a ifosfamida, um medicamento antineoplásico, há relatos de que cada enantiômero é processado por uma rota metabólica diferente devido à estereosseletividade do metabolismo (WANG, LU, CHAN, 2000). Oxidação enantiosseletiva da ifosfamida foi demonstrada no fígado, contudo nunca havia sido relatada nos rins. Considerando que os enantiômeros da ifosfamida parecem ser igualmente efetivos, mas metabolizados por rotas diferentes, a substituição da mistura racêmica pela (R)-ifosfamida, na terapêutica clínica, pode reduzir o metabolismo renal e, conseqüentemente, reduzir a nefrotoxicidade (ALEKSA, ITO, KOREN, 2006).

Um dado não apresentado pelo fabricante do mitotano (Lisodren, Bristol Myers-Squibb) é a presença de um centro assimétrico (Figura 1), que pressupõe a existência de enantiômeros, R e S, demonstrados na Figura 5. Esta situação indica que o medicamento é fornecido na forma de mistura (racêmica), o que pode ser extremamente preocupante, do ponto de vista da saúde.

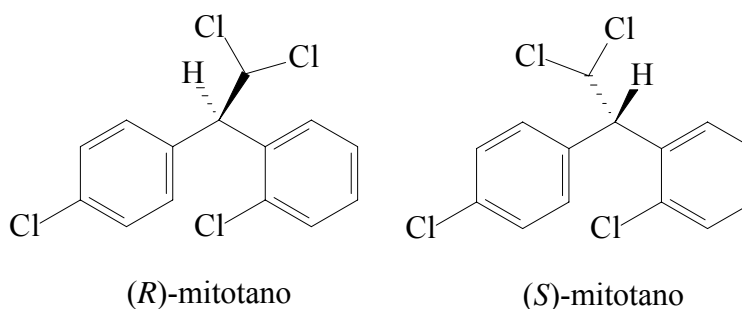


FIGURA 5 – ESTRUTURA DOS ENANTIÔMEROS (R) E (S) DO MITOTANO

Para o mitotano, não há relatos na literatura sobre possíveis diferenças na ação farmacológica, metabolização e reações adversas dos enantiômeros, bem como não existem informações, até o momento, sobre a proporção entre os dois isômeros no sangue de pacientes em tratamento. A investigação de possíveis diferenças farmacológicas e/ou tóxicas entre os enantiômeros pode ser muito útil e extremamente

importante. Para tanto, o desenvolvimento de técnicas de resolução de enantiômeros, em escala preparativa e analítica, é indispensável, além de um desafio acadêmico (GÜBITZ e SCHMID, 2006; ALI et al., 2006).

2.2.6 Separação enantiomérica do mitotano

O desenvolvimento de métodos rápidos, reprodutíveis e com custo acessível para a resolução de enantiômeros em medicamentos ainda é uma área a ser explorada. Duas categorias de métodos têm sido utilizadas na resolução de enantiômeros, em escala preparativa ou analítica, os clássicos, como degradação enzimática e cristalização, ou os modernos, como eletroforese, espectroscopia e cromatografia (ALI et al., 2006).

Nas últimas décadas, a cromatografia líquida de alta eficiência quiral tem sido crescentemente empregada na separação analítica e preparativa de enantiômeros (DEL RIO, 2005), cujos seletores quirais apresentam diferentes formatos, como cavidades e cestas. A captura dos enantiômeros nestas cavidades é estabilizada por várias interações, como ligações de hidrogênio, ligações de coordenação, forças de atração eletrostática, interações π - π , forças de van der Waals, efeitos estéricos, dipolo induzido e forças dispersivas (ALI et al., 2006). Ao ser capturado no interior da fase estacionária quiral, cada enantiômero forma complexos transientes com esta, que associados às interações já descritas, são decisivos para a resolução (ALI et al., 2006; DEL RIO, 2005).

As ciclodextrinas (CD) (Figura 6) utilizadas como fases estacionárias em cromatografia líquida de alta eficiência quiral, são oligossacarídeos cíclicos com seis a doze unidades de D-(+)-glicopiranosose com ligação glicosídica $\alpha(1,4)$ e conformação de cadeira. A γ -CD possui oito unidades de D-(+)-glicopiranosose. O primeiro grupo -OH em C-6, livre para rodar, pode obstruir parcialmente a cavidade de uma extremidade da CD. A entrada da cavidade da CD do lado oposto é enriquecida pela presença de -OH secundário em C-2 e C-3. Esse arranjo favorece a interação com várias misturas racêmicas, com formação de diastereoisômeros e conseqüente resolução. A presença de unidades de glicopiranosose esteroespecíficas restringe a rotação conformacional e a orientação dos grupos -OH secundários, que supostamente são responsáveis pela

capacidade de reconhecimento quiral das CD. Basicamente, os enantiômeros entram nas cavidades da CD e suas interações com a fase estacionária quiral leva a uma retenção diferenciada e, conseqüentemente, à resolução.

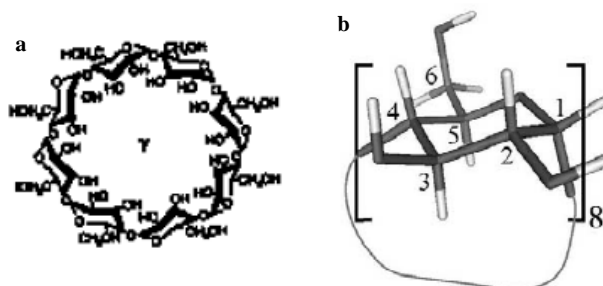


FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DA MOLÉCULA DA γ -CICLODEXTRINA.
FONTE: TÁRKÁNYI, 2002

Para a resolução dos enantiômeros do mitotano, BUSER e MÜLLER (1995) testaram colunas quirais de α , β e γ -ciclodextrina permetilada (Marcherey-Nagel, Düren, Alemanha), metanol-água 80:20 (v/v) e acetato de trietilamina pH 4,5 como fase móvel, que foi dispensada a uma taxa de 0,8 mL/minuto, à temperatura ambiente. A detecção dos compostos foi realizada na faixa do ultravioleta, a 250 nm de comprimento de onda. A rotação ótica dos enantiômeros foi monitorada através de luz mono e policromática. Utilizando a coluna de γ -ciclodextrina permetilada e as condições cromatográficas já descritas, foi obtida uma resolução satisfatória entre os enantiômeros do mitotano (4,7).

Para determinar se a configuração absoluta do [1,1,1-tricloro-2-(o-clorofenil)-2-(p-clorofenil)etano] ou (-)-2,4-DDT, BUSER e MÜLLER (1995) utilizaram cristalografia de raio-X. Por analogia, extrapolando os dados de configuração absoluta obtidos para o (-)-2,4-DDT, os autores deduziram as configurações absolutas dos enantiômeros do 2,4-DDD, conforme apresentado na Tabela 3.

TABELA 3 – CONFIGURAÇÃO RELATIVA E ABSOLUTA DO o,p-DDD e o,p-DDT

| COMPOSTO | t _R | SEQÜÊNCIA DE ELUIÇÃO | RESOLUÇÃO | ROTAÇÃO ÓTICA |
|---------------|----------------|----------------------|-----------|---------------|
| R-(+) 2,4-DDD | 12,3 | 2 | 4,7 | Dextro |
| S-(-) 2,4-DDD | 10,2 | 1 | | Levo |
| R-(-) 2,4-DDT | 11,7 | 2 | 4,4 | Levo |
| S-(+) 2,4-DDT | 9,6 | 1 | | Dextro |

FONTE: BÜSER E MÜLLER, 1995

NOTAS: t_R – tempo de retenção (fase estacionária - γ -ciclodextrina; fase móvel - metanol-água 80:20 (v/v) e acetato de trietilamina pH 4,5; 0,8 mL/minuto; detecção no UV, a 250 nm de comprimento de onda).

De acordo com BUSER e MÜLLER (1995), os compostos 2,4-DDD e 2,4-DDT com a mesma configuração (R ou S) apresentam sinais invertidos quanto ao desvio da luz polarizada.

Com o intuito de separar os enantiômeros do mitotano, ALI e ABOUT-ENEIN (2002) utilizaram três diferentes colunas quirais de polissacarídeo, fabricadas pela Daicel Chemical Industries (Tóquio, Japão). Uma resolução modesta dos enantiômeros do mitotano (0,6) foi obtida apenas com a coluna Chiralpak AD-R (amilose tris 3,5 dimetilfenilcarbamato), utilizando acetonitrila 2-propanol 50:50 (v/v) como fase móvel, a uma taxa de 1 mL/minuto, a 23 ± 1 °C, com detecção em UV em comprimento de onda de 220 nm. O método não foi testado em amostras biológicas. O mecanismo de reconhecimento quiral das fases estacionárias compostas de polissacarídeos, em termos moleculares, ainda não é claramente conhecido. Entretanto há relatos de que a separação é obtida pelas interações de hidrogênio, π - π e dipolo-dipolo induzido entre a fase estacionária de polissacarídeos e os átomos de cloro dos analitos, o,p-DDT e o mitotano (ALI e ABOUT-ENEIN, 2002).

Em função da importância ambiental dos pesticidas organoclorados, a literatura traz relatos de desenvolvimento de métodos para quantificação do inseticida o,p-DDT e seus análogos (entre eles, o o,p-DDD) em amostra ambientais (ARMSTRONG, REID, HILTON, CHANG, 1993). Foi descrito um método de cromatografia líquida acoplada a

espectrometria de massa, com coluna quiral de β -ciclodextrina, aplicada a 19 inseticidas de diferentes classes, que não foi adequada para resolver os picos dos enantiômeros do o,p-DDT e do o,p-DDD (JAUS, OEHME, 2001). Os enantiômeros do o,p-DDT e o,p-DDD, entre outros análogos, foram resolvidos empregando-se coluna quiral de γ -ciclodextrina e cromatografia eletrocinética micelar. Nesta técnica, micelas carregadas são adicionadas à fase móvel e a separação dos pesticidas neutros é baseada no coeficiente de partição relativo entre a água e a fase micelar (SCHMIDTT, GARRISON, FREITAG, KETTRUP, 1997).

Pesticidas organoclorados foram analisados em 28 amostras de solos do Alabama, utilizando cromatografia em fase gasosa capilar acoplada à espectrometria de massa e coluna de β -ciclodextrina para resolução dos enantiômeros de o,p-DDT (WIBERG, HARNER, WIDEMAN, BIDDLEMAN, 2001). A ordem de eluição para os enantiômeros do o,p-DDT foi obtida da literatura (BÜSER e MULLER, 1995). Dentre as 28 amostras de solo analisadas, o enantiômero (-) estava em excesso em 11; o enantiômero (+) estava em excesso em 10; as 7 amostras remanescentes eram racêmicas. Os motivos dos excessos enantioméricos nas amostras não foram investigados, mas os autores indicam, como possível explicação, diferenças nos microrganismos dos solos regionais (WIBERG, HARNER, WIDEMAN, BIDDLEMAN, 2001).

As proporções enantioméricas entre os isômeros do o,p'-DDD, o,p'-DDT e do alfa-hexaclorociclohexano (α -HCH) foram determinadas em amostras de 112 placentas humanas colhidas de 1997 a 2001. Para o o,p'-DDD e o α -HCH, foram identificadas variações nas proporções enantioméricas em função da concentração total do composto na amostra. Quando as concentrações do composto são altas, a proporção entre os enantiômeros é próxima de 1 (mistura racêmica). Em concentrações menores, as proporções são diferentes de 1. A relação entre proporção enantiomérica e a concentração é clara. Esta relação parece ser importante para determinação da exposição e do risco de tecidos e de espécies específicas e pode ser um dado valioso na indicação se a captação do ambiente ou a atividade metabólica é dominante para o resultado da exposição aos enantiômeros (SHEN et al., 2006).

2.3 Lipossomas na encapsulação de ativos

A característica lipofílica do mitotano tem grande influência na absorção, na distribuição e na obtenção de concentrações plasmáticas consideradas terapêuticas. Apenas 60 % da dose administrada por via oral é absorvida, com acúmulo em tecidos adiposos, inclusive no tecido gorduroso cerebral, o que causa demora na obtenção de concentrações plasmáticas terapêuticas e pode conduzir a efeitos adversos severos e graves, especialmente neurológicos. O desenvolvimento de novas formulações pode ajudar a contornar estes problemas.

Nas últimas décadas, as pesquisas em tecnologia farmacêutica têm se voltado para o desenvolvimento de sistemas de liberação para a administração de fármacos já utilizados na terapêutica. Com a introdução do conceito de biodisponibilidade (quantidade de princípio ativo disponível no local de ação), surgiu uma preocupação direta com as propriedades físico-químicas relacionadas à solubilidade e à estabilidade das formulações farmacêuticas, além do seu comportamento *in vivo*. Um número cada vez maior de sistemas de liberação de fármacos tem sido proposto e extensivamente avaliado quanto aos aspectos relacionados à disponibilidade biológica. Esses sistemas podem promover concentrações maiores do ativo nos locais onde ele deve exercer seus efeitos farmacológicos, obtidas com doses menores, diminuindo a toxicidade para tecidos não específicos (KOKKONA et al., 2000).

Os sistemas coloidais para transporte de fármacos, entre eles os lipossomas, têm sido empregados com sucesso na área farmacêutica (STORM e CROMMELIN, 1998; VILLANOVA e CONSIGLIERI, 1999; ALVES e SANTANA, 2004). Os lipossomas ou vesículas de fosfolípidios (Figura 7) são agregados de fosfolípidios em estruturas de bicamada, contendo um volume aquoso central circundado por uma ou várias lamelas concêntricas, formando partículas unilamelares ou multilamelares, com diâmetros da ordem de dezenas de nanômetros a dezenas de micra. No processo de formação, os lipossomas encapsulam parte do meio aquoso em que estão dispersos. A bicamada formada é capaz de acomodar as moléculas hidrofóbicas e comportar-se como uma

membrana semi-permeável com relação ao material encapsulado no volume aquoso das vesículas (LASIC, 1993; CROMMELIN e SCHREIER, 1994).

Substâncias com variados graus de hidro ou lipofilia podem ser encapsuladas em lipossomas (Figura 7), seja na bicamada lipídica ou no compartimento aquoso, com melhorias nas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, quando comparado ao fármaco livre. A encapsulação de fármacos em lipossomas pode aumentar sua absorção, melhorar a eficácia terapêutica, reduzir a toxicidade e prolongar o tempo de ação (SHARMA e SHARMA, 1994).

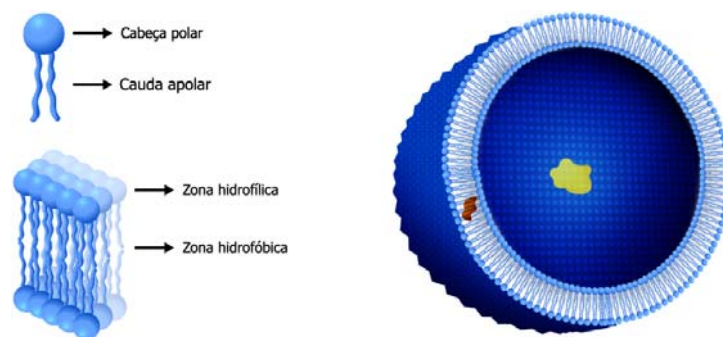


FIGURA 7 – FORMAÇÃO DE BICAMADAS E LIPOSSOMAS DE FOSFOLÍPIDIOS EM MEIO AQUOSO

Alguns fármacos já são comercializados na forma encapsulada (em lipossomas) e utilizados na clínica, como o antifúngico Anfotericina B (AmBisome, Gilead Sciences e Fugisawa Healthcare; Abelcet, da Enzon; Amphocil, da Astra Zeneca e Beacon Pharmaceutical) e os antineoplásicos doxorrubicina (Caelix, da Schering-Plough; Myocet, da Ela; Doxil, da Ortho Biotech) e daunorrubicina (DaunoXome, da Gilead Sciences), todos para administração por via parenteral. As bulas dos fabricantes indicam uma diferença impactante na farmacocinética e farmacodinâmica entre as doxorrubicinas lipossomais Doxil e Myocet devido à utilização de diferentes tipos de lipossomas, tamanhos e métodos de incorporação (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2008).

Para ser potencialmente utilizados na prática clínica, os sistemas lipossomais devem possibilitar alta eficiência de encapsulação do fármaco, traços de solventes orgânicos ou detergentes devem ser removidos, o produto final deve ser passível de esterilização (quando a via de administração é parenteral) e sua produção em larga escala deve ser viável (VILLANOVA e CONSIGLIERI, 2000).

Para a produção de lipossomas, moléculas lipídicas devem ser introduzidas em ambientes aquosos. Para otimizar a hidratação das moléculas de lipídios e contornar sua baixa solubilidade em água, métodos como o preparo de um filme lipídico seco através da evaporação de solvente orgânico, obtenção de partículas lipídicas porosas através de secagem a baixas temperaturas (*freeze drying method*), ou obtenção de partículas finas através de secagem por atomização (*spray-drying*) são utilizados. As partículas ou o filme lipídico obtidos por um dos métodos citados, contendo ou não o princípio ativo incorporado, são introduzidos em sistemas aquosos para a obtenção das vesículas plurilamelares de lipossomas (ALVES e SANTANA, 2004; LASIC 1993).

A técnica de secagem por atomização (*spray drying*) tem sido bem sucedida na microincorporação de moléculas bioativas como enzimas, sabores e princípios ativos, bem como no preparo de variados sistemas elaborados com polímeros biodegradáveis. O uso da secagem por atomização foi recentemente citado como método escalonável para a obtenção de lipídios secos, para produção secundária de lipossomas através de hidratação. Adicionalmente, as partículas secas de fosfolipídios obtidas pela secagem por atomização têm sido estudadas como eficientes carreadores de ativos capazes de manter a integridade estrutural, estabilidade e funcionalidade do princípio ativo, como o DNA (ALVES e SANTANA, 2004).

Para investigar a adequação de solventes parcialmente miscíveis em água para o preparo de nanossuspensões, TROTTA, GALLARATE, PATTARINO, MOREL (2001) utilizaram o mitotano como modelo de substância ativa com baixa solubilidade em água e baixa biodisponibilidade, tendo sido obtidas partículas com diâmetro inferior a 100 nm e baixa polidispersidade. A taxa de dissolução das nanossuspensões de mitotano foi maior, quando comparada com o produto comercial. As nanossuspensões não foram submetidas aos ensaios *in vitro* e/ou *in vivo*.

2.4 Avaliação *in vitro* e *in vivo* de formulações de medicamentos

A biodisponibilidade representa a quantidade e a velocidade com que um composto ativo absorvido de uma forma farmacêutica atinge a circulação sangüínea. Para atingir a circulação sangüínea, é necessário que as moléculas atravessem uma ou várias membranas biológicas. A quantidade de fármaco que atinge a circulação sangüínea pela via oral é afetada por várias propriedades físico-químicas do ativo, como massa molar, pKa, solubilidade, lipofilicidade, além da formulação, forma farmacêutica, pH gastrintestinal, trânsito gastrintestinal, interações com muco e alimentos, entre outros fatores. Durante o desenvolvimento de um fármaco para administração oral, é importante a otimização da sua biodisponibilidade (BARTHE et al., 1999). A encapsulação do mitotano em lipossomas foi proposta visando aumento da sua solubilidade em líquidos biológicos, esperando uma maior biodisponibilidade. A otimização da biodisponibilidade pode ser investigada pela estimativa de absorção (mediante determinação de permeação intestinal) e pela administração crônica a animais, para determinação da concentração plasmática.

O estudo do mecanismo de permeação intestinal pode ser realizado por ensaios *in vivo* ou *in vitro*, muitos deles utilizados pela indústria farmacêutica no estudo de novos fármacos. Dentre os ensaios *in vitro*, destacam-se as técnicas das câmaras com medida do fluxo epitelial; técnica do cultivo de células, por exemplo, do tipo Caco-2, em monocamadas (DODANE et al., 1999) e a técnica do intestino invertido.

A técnica do intestino invertido consiste na inversão de segmentos intestinais utilizando uma haste flexível, enchimento com uma solução tampão oxigenada, amarração das extremidades e colocação em meio tamponado, oxigenado e sob agitação, contendo o soluto em estudo. A permeação do soluto é detectada pela variação da sua concentração no meio externo e/ou interno ao longo do tempo (ACRA, GHISHAN, 1991).

Outro método bastante utilizado é a realização de ensaios *in vivo*, com administração, aguda ou crônica, do medicamento em estudo, comparado com medicamentos ou formulações de referência, para avaliação da farmacocinética. A

farmacocinética é a ciência que estuda a dinâmica das drogas nos sistemas biológicos, envolvendo a absorção, a distribuição, o metabolismo e a eliminação. A determinação da concentração plasmática das drogas, após administração, pode ser utilizada para determinação da sua biodisponibilidade comparativa.

Tanto os ensaios *in vitro* (permeação intestinal) quanto *in vivo* (administração oral) precisam de métodos analíticos para determinação da concentração do ativo em diferentes meios e líquidos biológicos. Para evidenciar a adequação do método analítico, recomenda-se sua validação.

2.5 Validação de métodos analíticos e bioanalíticos

A validação de uma metodologia analítica consiste na comprovação, através de evidências objetivas, de que são respeitados os requisitos específicos para uma determinada utilização pretendida (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2001). Segundo a ANVISA (2003) a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências para as aplicações pretendidas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Quando laboratórios reproduzem métodos oficiais, com relação aos parâmetros de desempenho e critérios de aceitação, os métodos são considerados validados mediante a avaliação de parâmetros como precisão, especificidade e linearidade. Metodologias não-oficiais são consideradas validadas mediante avaliação da especificidade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez, quando aplicável (ANVISA, 2003).

Especificidade é a capacidade do método de avaliar um composto em presença de outras substâncias, como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. A determinação da especificidade é imprescindível para que se possam avaliar possíveis resultados falsos negativos, falsos positivos e se a quantificação é apreciavelmente influenciada por interferentes (ANVISA, 2003).

Linearidade é a capacidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma faixa especificada (ANVISA, 2003). A verificação da linearidade na curva analítica é essencial, pelo impacto que possui na aplicabilidade, na precisão e na exatidão do método proposto (SOUZA e JUNQUEIRA, 2005).

A precisão é representada pela dispersão de resultados entre ensaios independentes e repetitivos, realizados com amostras semelhantes ou padrões, utilizando condições definidas, sendo normalmente expressa como desvio padrão. A precisão depende da concentração do analito e deve ser determinada para um diferente número de concentrações.

Exatidão é o grau de concordância entre os resultados obtidos pelo método em relação ao valor verdadeiro (ANVISA, 2003). Para avaliação da exatidão, usualmente são utilizados materiais de referência, comparações interlaboratoriais e testes de recuperação (INMETRO, 2003).

A recuperação está relacionada à exatidão, pois determina a quantidade do analito recuperado no processo de preparo da amostra (ANVISA, 2003). A exatidão pode ser estimada através da recuperação da substância de interesse adicionada a uma matriz em branco (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2002).

O limite de detecção é a menor quantidade de fármaco presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003). O limite de detecção do equipamento (LDE) é definido como uma concentração do analito que produza um sinal três vezes superior à relação sinal/ruído (INMETRO, 2003; ANVISA, 2003). O limite de detecção do método (LDM) é a menor concentração de uma substância que pode ser detectado com 95 % ou 99 % de confiança de que a concentração do analito é maior que zero (INMETRO, 2003).

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

A validação de métodos analíticos para a quantificação de substâncias ativas em medicamentos e formulações é uma exigência regulamentar o órgão público de saúde competente, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil e a *Food and Drug Administration* (FDA) nos EUA.

Este projeto foi desenvolvido com a inestimável colaboração e parceria da Prof. Dra. Maria Helena Andrade Santana e Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana (Faculdade de Engenharia Química - FEQ da Unicamp), do Prof. Dr. Bonald Cavalcanti Figueiredo (IPPP e Faculdades Pequeno Príncipe), e do Msc. Daniel Altino de Jesus (Laboratório Central do Estado - LACEN).

3 Objetivos

Objetivo geral

Contribuir para a melhoria do tratamento do carcinoma adrenocortical com mitotano.

Objetivos específicos

- Investigar se há absorção diferencial dos isômeros R e S do mitotano durante a permeação intestinal.
- Investigar se há metabolização diferencial dos isômeros R e S do mitotano em pacientes tratados com o medicamento.
- Encapsular a mistura racêmica em lipossomas.
- Caracterizar parâmetros físico-químicos das partículas secas e vesículas hidratadas (lipossomas), contendo o mitotano encapsulado.
- Investigar o impacto da encapsulação do mitotano em lipossomas na permeação intestinal, comparando com formulações padrão.
- Investigar o impacto da encapsulação do mitotano em lipossomas nas concentrações plasmáticas em ratos submetidos a tratamento crônico, em comparação com formulações padrão.

4 Experimental

4.1 Especificação dos equipamentos, materiais, reagentes e solventes

4.1.1 Equipamentos e materiais

- O *Spray drying* modelo Büchi, empregado para a obtenção das partículas fosfolipídicas secas, foi utilizado no Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp.

- O microscópio eletrônico de varredura utilizado na caracterização das partículas fosfolipídicas sólidas é da marca Leica modelo LEO 440 i, operando entre 5-6 kV, e foi utilizado no Laboratório de Uso Comum da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp

- O difratograma de Raio-X, Shimadzu Co., modelo XRD-6000, aplicado na caracterização das partículas fosfolipídicas sólidas, está disponível no Departamento de Química, UFPR

- A técnica de espectroscopia de correlação de fótons para determinação do diâmetro hidrodinâmico dos lipossomas foi realizada no equipamento Malven Autosizer, modelo 4700, do Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp.

- As análises empregando o cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em equipamento Varian, com bomba quaternária modelo 9012Q, detector ultravioleta de fotodiodo modelo 9065 e injetor automático modelo AI200, do Departamento de Química da UFPR. Em momentos distintos, foi utilizada uma coluna Nucleosil C-18 (4,6 x 250 mm) e uma coluna de γ -ciclodextrina. Para tais determinações, foram empregados reagentes e solventes grau HLPC, como acetona, metanol, hexano e acetonitrila.

- As análises em cromatógrafo em fase gasosa com detecção por captura de elétrons (CG-CE) foram realizadas em equipamento Varian 3400, com injetor automático, disponível no Laboratório Central do Estado do Paraná – LACEN PR, uma coluna apolar contendo CP-SIL 8CB (25 m x 0,15 mm x 0,12 μ m) e hidrogênio como gás carreador. Os solventes acetona, hexano, diclorometano com pureza de 99,9 % foram utilizados para realização da técnica CG-CE.

▪ Os ensaios *in vitro* e *in vivo* foram realizados no Centro de Genética e Pesquisa do Câncer em Crianças (CEGEMPAC), mantido pela Associação Paranaense de Apoio à Neoplasia e pela UFPR. Durante os experimentos, os animais foram acomodados em biotério climatizado existente no CEGEMPAC.

▪ Para determinação da atividade ótica dos enantiômeros do mitotano foi utilizado o polarímetro Rudolph Research Analytical, modelo Autopol IV, disponível no Departamento de Bioquímica da UFPR.

4.1.2 Reagentes e solventes

▪ Os comprimidos de mitotano, nome comercial Lisodren 500mg, foram obtidos da Bristol Myers-Squibb.

▪ O padrão de mitotano (mistura racêmica) foi adquirido da *The United States Pharmacopeia* (USP).

▪ O mitotano puro (mistura racêmica) foi adquirido da Yick-Vic Chemicals & Pharmaceuticals (Hong Kong).

▪ A dieta enteral Trigliceril CM[®], produzida pelo grupo Royal Numico, foi adquirida de um distribuidor local.

▪ Para extração em fase sólida foi utilizado o Florisil da U.S. Sílica, majoritariamente composto por dióxido de silício.

4.2 Determinação quiral do mitotano em plasma

4.2.1 Separação dos enantiômeros em CLAE quiral

Os enantiômeros do mitotano foram qualitativamente separados no Laboratório de Bioseparações da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp e gentilmente cedidos. A atividade ótica de cada enantiômero foi determinada em um polarímetro Rudolph Research Analytical, modelo Autopol IV.

Soluções em acetona do padrão de mitotano (obtido da *The United States Pharmacopeial Convention Inc - USP*), com concentração de 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foram preparadas a partir de uma solução de trabalho de 1 mg.mL^{-1} em acetona, utilizando-se diluição seriada, balão volumétrico e pipeta para microvolumes (com medidas variáveis).

As soluções do padrão foram injetadas no sistema cromatográfico utilizando como fase estacionária uma coluna quiral de γ -ciclodextrina (Marcherey-Nagel, Düren, Alemanha). Para desenvolvimento do método foi utilizado planejamento fatorial de experimentos, fracionado, 2^{4-1} , tendo sido investigadas quatro variáveis em dois níveis, conforme apresentado na Tabela 4. Além dos oito experimentos previstos no planejamento fracionado, foram investigados os pontos médios. Em função da impossibilidade de misturar os solventes (acetonitrila e metanol) e os tampões (fosfato e trietilamônio) para o preparo dos pontos médios e para que todas as condições fossem investigadas, foram avaliados quatro diferentes pontos médios, em triplicata.

Os resultados foram avaliados em função da resolução, encaudamento e fator capacidade, parâmetros que indicam a eficiência na resolução de picos em cromatografia. É importante destacar que não há disponibilidade comercial de padrões para os enantiômeros R e S do mitotano, apenas para a mistura racêmica.

TABELA 4 – PLANEJAMENTO MULTIFATORIAL DE EXPERIMENTOS FRACIONADO: 2^{4-1}

| PLANEJAMENTO MULTIFATORIAL FRACIONADO | | | | |
|---------------------------------------|--------------------|------------------------------|--------|--------------|
| AMOSTRA | VARIÁVEIS E NÍVEIS | | | |
| | SOLVENTE | CONCENTRAÇÃO DO SOLVENTE (%) | TAMPÃO | pH DO TAMPÃO |
| 1 | + | + | + | + |
| 2 | - | + | + | - |
| 3 | - | - | + | - |
| 4 | + | - | - | - |
| 5 | - | + | - | + |
| 6 | + | - | + | + |
| 7 | + | + | - | - |
| 8 | - | - | - | + |
| 9 | - | média | - | média |
| 10 | - | média | - | média |
| 11 | - | média | - | média |
| 12 | + | média | - | média |
| 13 | + | média | - | média |
| 14 | + | média | - | média |
| 15 | - | média | + | média |
| 16 | - | média | + | média |
| 17 | - | média | + | média |
| 18 | + | média | + | média |
| 19 | + | média | + | média |
| 20 | + | média | + | média |

Variáveis e níveis: solvente: acetonitrila (+) ou metanol (-); concentração do solvente: 85 % (+) ou 75 % (-); tampão: TEAA (+) ou fosfato (-); pH do tampão: 4,5 (+) ou 6,0 (-).

3.2.2 Composição enantiomérica em plasma de pacientes

As amostras de plasma de cinco pacientes pediátricos, em tratamento com mitotano, foram obtidas através de punção periférica ou do catéter venoso central, com o anticoagulante heparina, imediatamente antes da administração da dose matinal do fármaco, de junho de 2003 a novembro de 2004. As amostras de sangue foram centrifugadas por 15 minutos. O sobrenadante (plasma) foi congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das determinações analíticas. Imediatamente antes da análise cromatográfica, as amostras foram descongeladas até temperatura ambiente. Utilizando pipeta para microvolumes variáveis, a acetona ($180\text{ }\mu\text{L}$) foi adicionada ao plasma ($120\text{ }\mu\text{L}$), a mistura foi agitada em vórtex por 60 segundos, centrifugada por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para frasco de vidro e analisado.

As análises foram realizadas em sistema para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da marca Varian, com bomba quaternária modelo 9012Q, detector ultravioleta de fotodiodo modelo 9065 e injetor automático modelo AI200. Os enantiômeros resolvidos por cromatografia preparativa foram separadamente injetados no sistema cromatográfico e utilizados como padrões, para identificação e confirmação da ordem de eluição.

4.3 Encapsulação do mitotano em lipossomas

As etapas para obtenção e caracterização das formulações são apresentadas no esquema apresentado na Figura 8.

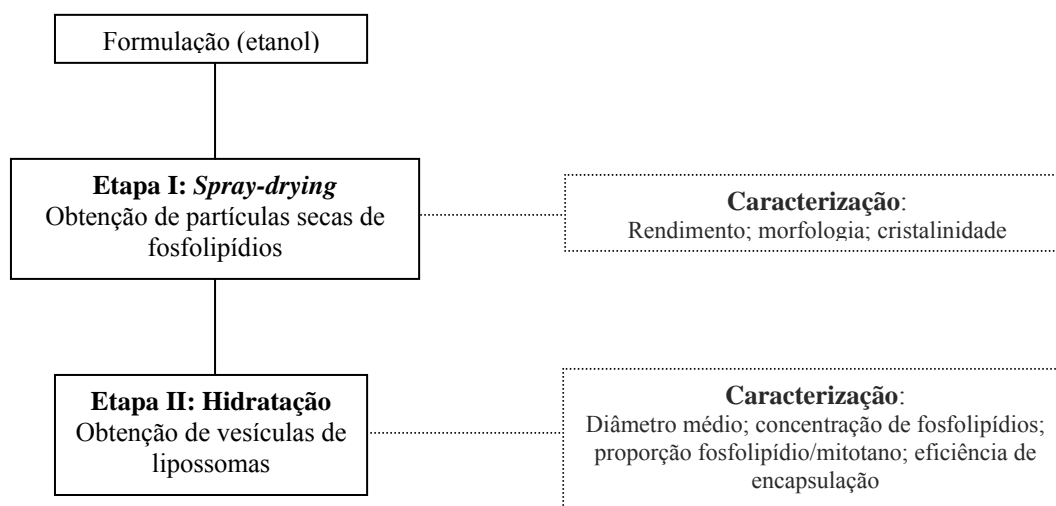


FIGURA 8 – OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

4.3.1 Obtenção das partículas fosfolipídicas secas

Utilizando as condições experimentais e os grupos de formulações já definidos por ALVES e SANTANA (2004) e apresentadas na Tabela 5, partículas secas de três grupos de formulações (aqui nomeados como grupo A, B e C), contendo a fosfatidilcolina de soja hidrogenada Lipoid SP C 3 (Lipoid GmbH, Alemanha) como principal constituinte, manitol e mitotano, em variadas proporções molares foram obtidas através de secagem por atomização em *spray drying*. O manitol é incluído nas formulações 5 a 11 para redução da cristalinidade. A estrutura do fosfolípido estrutural, a fosfatidilcolina de soja, é apresentada na Figura 9.

TABELA 5 – COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES, VAZÃO DE ALIMENTAÇÃO NO SECADOR E CONDIÇÕES OPERACIONAIS

| FORMULAÇÕES | | | CONCENTRAÇÕES (mM) | | | ETANOL qsp | VAZÃO DE ALIMENTAÇÃO mL.min ⁻¹ |
|-------------|----|------------|--------------------|----------|---------|---------------|---|
| | | | FOSFO- LIPÍDIO | MITOTANO | MANITOL | | |
| | 1 | Mitotano | - | 85 | - | 50mL | 20 |
| | 2 | Controle | 85 | - | - | 50mL | 20 |
| GRUPO A | 3 | L/M 1:1 | 170 | 170 | - | 100mL | 20 |
| | 4 | L/M 2:1 | 170 | 85 | - | 100mL | 20 |
| | 5 | Controle | 85 | - | 36 | 100mL | 20 |
| GRUPO B | 6 | L/M 1:1 | 85 | 85 | 36 | 100mL | 20 |
| | 7 | L/M 2:1 | 170 | 85 | 72 | 100mL | 20 |
| | 8 | Controle | 180 | - | 23 | 100mL | 3 |
| GRUPO C | 9 | L/M 1:0,25 | 180 | 45 | 92 | 100mL | 3 |
| | 10 | L/M 1:1 | 180 | 180 | 92 | 100mL | 3 |
| | 11 | L/M 2:1 | 180 | 90 | 92 | 100mL | 3 |

NOTAS: qsp – quantidade suficiente para completar um volume definido; L/M – proporção molar entre fosfolípido e mitotano. Condições operacionais: bico atomizador do tipo duplo fluido com 1 mm de diâmetro; temperatura de atomização de 90 °C + 5 °C.

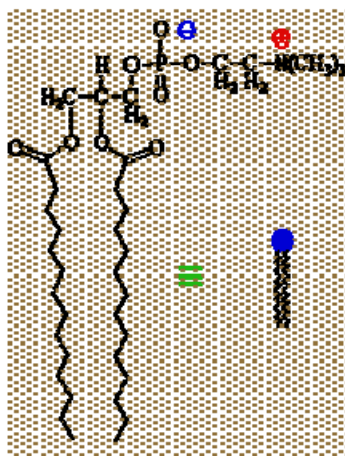


FIGURA 9 – FOSFATIDILCOLINA DE SOJA UTILIZADA COMO CONSTITUINTE ESTRUTURAL NAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS

Os componentes de cada formulação foram dispersos em etanol (quantidade suficiente para 50 ou 100 mL). Todas as amostras foram submetidas à secagem, em *spray-drying*, utilizando um bico atomizador com 1 mm de diâmetro do tipo fluido duplo e submetidas à secagem a $90\text{ }^{\circ}\text{C} + 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ em um fluxo de ar contra-corrente, com taxas de alimentação de 3 ou $20\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. As partículas foram recolhidas em um reservatório conectado a um ciclone e foram armazenadas sob refrigeração até sua caracterização ou aplicação posterior.

4.3.2 Caracterização das partículas fosfolipídicas secas

3.3.2.1 Rendimento da produção de partículas

O rendimento mássico (R) do processo de obtenção das partículas secas em *spray-drying* foi calculado através da Equação 1, na qual mF é a massa final obtida após a secagem por atomização e mI é a massa inicial pesada para a preparação da solução de alimentação.

$$R = \frac{mF}{mI} \times 100$$

R = rendimento (em porcentagem)

mF = massa final

mI = massa inicial

EQUAÇÃO 1 – CÁLCULO DO RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS

3.3.2.2 Morfologia

A morfologia das partículas secas foi verificada através de microscopia eletrônica de varredura usando um microscópio Leica, modelo LEO 440 i, operando entre 5-6 kV. Antes da análise, as amostras foram metalizadas com ouro (ALVES e SANTANA, 2004; EDWARDS e BAUMMER, 2006).

3.3.2.3 Cristalinidade (difratogramas de raios-X)

A cristalinidade das formulações foi determinada por difração de raio-X (SHIMADZU Co., modelo XRD-6000, Kyoto, Japão). As análises foram realizadas a temperatura ambiente usando miligramas de cada amostra e uma velocidade de varredura de 2 ° por minuto, entre 35 ° e 10 ° (2 Θ), 30 KV e 40 mA (ALVES e SANTANA, 2004; EDWARDS e BAUMMER 2006).

4.3.3 Obtenção de lipossomas

Para obtenção dos lipossomas, as partículas secas obtidas na etapa descrita em 3.3.1 devem ser inseridas em solução aquosa, quando são formadas as vesículas lipossomais, mediante direcionamento das cabeças polares para o lado externo e interno (em contato com a água), enquanto as caudas apolares são acomodadas entre si. Para tanto, as partículas secas foram hidratadas por agitação mecânica, conforme condições padronizadas por ALVES e SANTANA (2004), utilizando solução tampão Hepes/NaCl (10mM/20mM) pH 7,4.

A hidratação com agitação mecânica foi realizada em duas etapas, em busca de uma maior eficiência de incorporação do meio aquoso. Inicialmente, uma quantidade de partículas (correspondendo a 5 mM de SP C 3) foi colocada num béquero com camisa de

aquecimento, mantido a 65 °C, e foi adicionado 30 % do volume total de tampão (9 mL). Esta mistura, de consistência pastosa, foi agitada a 10 rpm por 15 minutos com um impelidor do tipo âncora. Posteriormente, o restante do volume aquoso tamponado foi adicionado (21 mL), sendo iniciada a segunda fase de agitação (1000-4000 rpm por 15 minutos), com haste do tipo pá dentada e excesso de tampão aquoso, para formação dos lipossomas (ALVES e SANTANA, 2004). Em seguida, as vesículas de lipossomas foram caracterizadas.

4.3.4 Caracterização dos lipossomas

3.3.4.1 Diâmetro médio e distribuição de tamanhos

O diâmetro médio e a distribuição de tamanho dos lipossomas foram determinados por espectroscopia de espalhamento de luz de alta frequência, obtida por incidência de raios laser (método *quasi-elastic light scattering*, QELS), em um equipamento da Malven Autosizer, modelo 4700 (ALVES e SANTANA, 2004; EDWARDS e BAUMMER 2006).

3.3.4.2 Concentração de fosfolipídios

A concentração de fosfolipídios nas partículas secas foi determinada pelo teor de fosfato utilizando o método descrito por CHEN (1956). Esse método consiste na oxidação com ácido sulfúrico dos compostos de carbono a carbono elementar, que é então transformado em dióxido de carbono pelo peróxido de hidrogênio livre de fosfato. O fósforo é transformado em ortofosfato, que forma um complexo com o molibdato de amônio. Quando este complexo é reduzido pelo ácido ascórbico há o aparecimento da cor azul, cuja intensidade é proporcional à concentração de fosfato na amostra e é mensurada em espectrofotômetro (ultravioleta) a 830 nm. O mesmo procedimento é aplicado para as soluções padrão, com concentrações conhecidas de fosfato e para a solução isenta de fosfato (branco). Uma curva analítica com cinco pontos foi preparada, a partir de uma solução padrão de fosfolipídio contendo 3 mg.mL⁻¹. Cada ponto da curva analítica foi avaliado em triplicata. O procedimento segue representado no esquema da Figura 10.

O aquecimento a 280 ° C foi realizado em chapa aquecedora, acomodada dentro de capela de exaustão. As amostras foram inseridas em tubos de vidro, altos (para minimização de respingos) contendo pérolas de vidro.

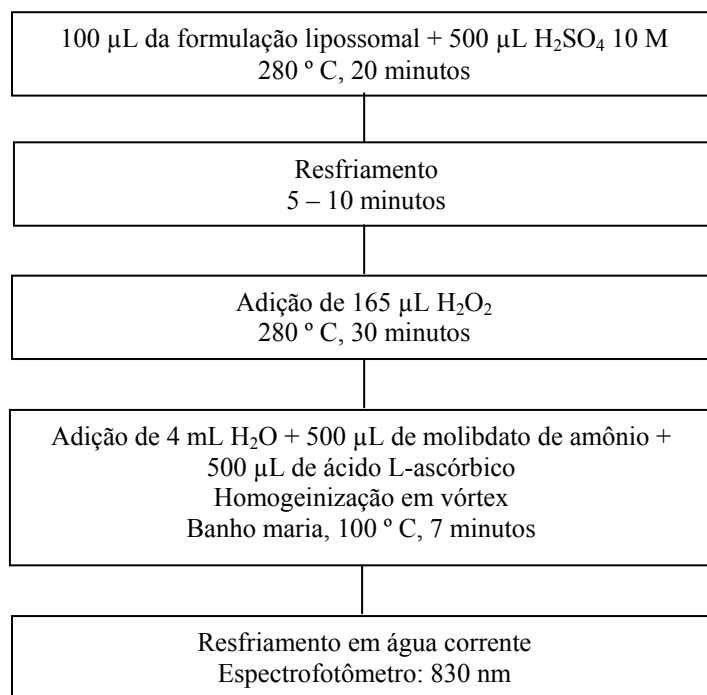


FIGURA 10 – QUANTIFICAÇÃO DE FOSFATO NAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS

3.3.4.3 Proporção molar fosfolípido/mitotano por determinação indireta

Considerando a massa inicialmente utilizada na secagem por atomização, a concentração molar de fosfolípido determinada pelo ensaio fosfato e a massa recuperada após a secagem por atomização, foi possível estimar, indiretamente, a concentração molar de mitotano em cada formulação, bem como a relação molar fosfolípido/mitotano (L/M).

3.3.4.4 Eficiência de encapsulação e concentração total de mitotano

Lipossomas contendo o fármaco encapsulado foram separados da fração de mitotano livre por migração diferencial das populações, em função da densidade, em camadas com diferentes concentrações de sacarose. A eficiência da encapsulação foi determinada mediante separação do ativo não encapsulado por densidade diferencial em

gradiente de sacarose (NEW, 1990) e posterior quantificação de mitotano nas camadas utilizando CLAE.

O preparo dos gradientes de sacarose está representado na Figura 11. O primeiro gradiente descontínuo (a) foi construído com duas concentrações de sacarose, 50 % e 15 % (m/v), 500 μ L de cada, preparadas em 5mM tris-HCl pH 7,5. O segundo gradiente descontínuo (b) foi construído com duas concentrações de sacarose, 25 % e 15 % (m/v), 500 μ L de cada, preparadas em 5mM tris-HCl pH 7,5. O gradiente contínuo (c) foi construído com três concentração de sacarose, 11 %, 12 % e 13 % (m/v), 500 μ L de cada, em 5mM tris-HCl pH 7,5. No topo de cada gradiente foram aplicados 100 μ L da formulação em análise.

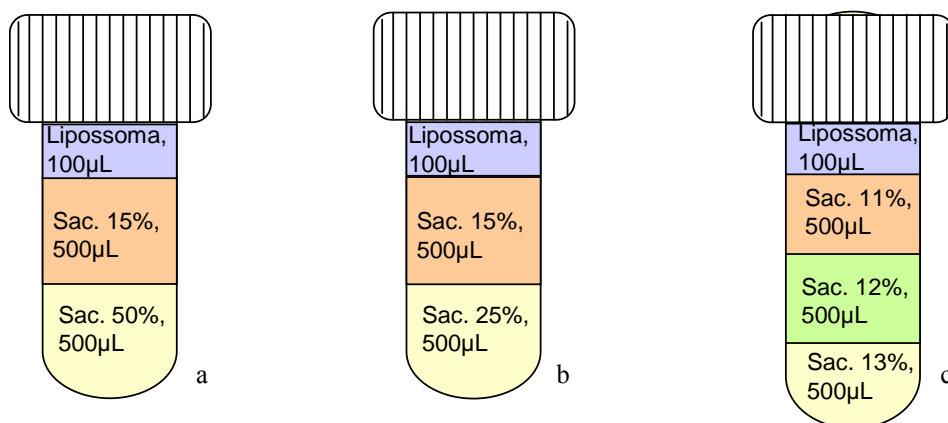


FIGURA 11 – GRADIENTES DE SACAROSE PARA A SEPARAÇÃO DO MITOTANO NÃO ENCAPSULADO

(a) Sacarose 15 %; Sacarose 50 %. (b) Sacarose 15 %; Sacarose 25 %.
(c) Sacarose 11 %; Sacarose 12 %; Sacarose 13 %.

Depois de estruturados os gradientes, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g durante 4 horas e as diferentes camadas foram avaliadas quanto ao diâmetro das partículas por espectroscopia de correlação de fótons e quantificação de mitotano em CLAE.

Para determinação da concentração total de mitotano, utilizando pipetas de microvolumes variáveis, alíquotas de 250 μ L da suspensão lipossomal (da formulação em teste) foram misturadas a 325 μ L de acetona e submetidas ao mesmo procedimento analítico (CLAE) descrito para cada camada do gradiente de sacarose.

4.4 Estudo comparativo da permeabilidade intestinal do mitotano

O ensaio avalia a permeação de fármacos ao longo de segmentos intestinais imediatamente retirados de ratos vivos, com manutenção da atividade biológica ótima por até 2 horas mediante o uso de TC 199, que é um meio de cultivo para células, a 37 °C, para simular a temperatura do organismo, e sob agitação constante, que simula a homogeneização que ocorreria devido aos movimentos peristálticos. Este sistema é utilizado para verificar a captação de lipossomas, proteínas e macromoléculas que podem ser utilizadas no desenvolvimento de sistema para administração oral de fármacos (BARTHE et al., 1998; HE et al., 1998; BARTHE et al., 1999). O objetivo do ensaio foi avaliar, comparativamente, a taxa de permeação do mitotano através do segmento intestinal, do meio externo ao meio interno, nas diferentes formulações, sendo duas convencionais e uma formulação lipossomal, desenvolvida nesse trabalho.

Como meio de incubação foi utilizado o tampão TC 199, que mantém a viabilidade das células intestinais e possui a seguinte composição: cloreto de sódio 145 mM, cloreto de potássio 4,56 mM, cloreto de cálcio diidratado 1,25 mM, fosfato de sódio monobásico 5 mM, e, quando aplicável, 10 mM de glicose, pH 7,4.

Para a realização do ensaio, os segmentos intestinais foram rapidamente dissecados de ratos machos Wistar, vivos, com peso de 150 – 200 g. Porções de 7 cm do intestino delgado, correspondendo ao duodeno, foram rapidamente dissecados, lavados com solução tampão TC 199 a 10 °C, invertidos (externando a mucosa onde ocorre a absorção), com o auxílio de hastes flexíveis, amarrados com fio de sutura, preenchidos com o TC 199 e imediatamente incubados no meio de cultivo oxigenado (meio externo), conforme representado na Figura 12. O meio externo, para incubação dos segmentos intestinais, contém glicose e o fármaco em estudo (BARTHE et al., 1998; HE et al., 1998; BARTHE et al., 1999). Durante diferentes tempos, a concentração do fármaco permeada do meio externo para o meio interno (saco intestinal invertido) foi determinada. Este ensaio permite uma comparação entre taxas de permeação obtidas com diferentes formulações de um fármaco, como uma estimativa da absorção *in vivo*.

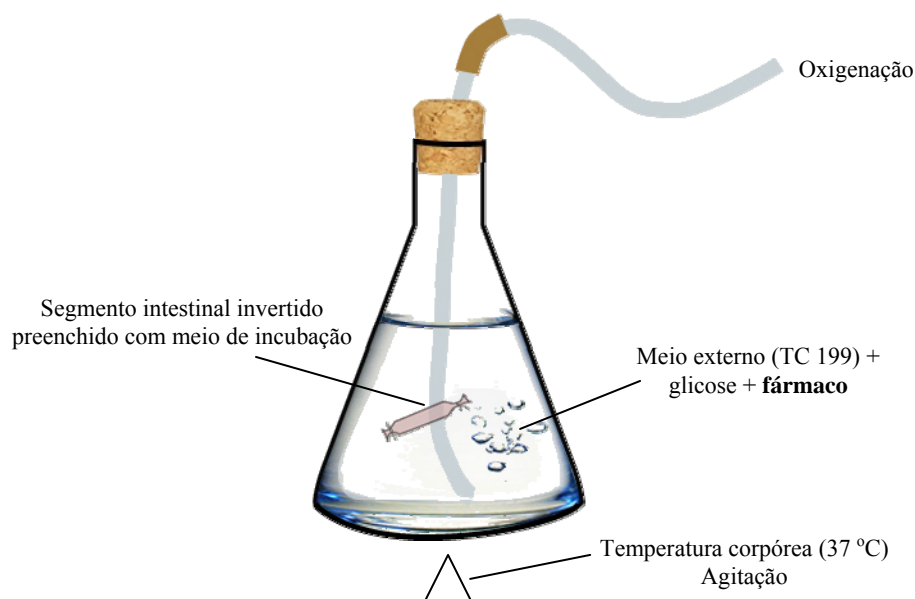


FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO TESTE DO INTESTINO INVERTIDO

Os animais foram divididos em três grupos, de acordo com a formulação de mitotano sob investigação. Os segmentos de duodeno foram incubados, separadamente, por tempos variando de 5 a 120 minutos, acrescidos de uma das três formulações de mitotano sob investigação. Após a incubação pelos períodos pré-determinados e em cada formulação testada, os segmentos intestinais foram removidos do meio de incubação, cuidadosamente lavados e, o conteúdo, centrifugado. As concentrações de mitotano foram determinadas nos três compartimentos: meio externo, segmento intestinal (substância ativa retida na mucosa intestinal) e meio interno (substância ativa permeada).

Para cada formulação, os intervalos de tempo estudados foram de 5; 10; 20; 40; 60; 80 e 120 minutos. Para cada tempo, foram utilizados três animais ($n = 3$). Como amostra controle (branco), foi conduzida uma incubação por 120 minutos, na ausência do fármaco.

As três formulações investigadas foram divididas em convencionais e lipossomal. As formulações convencionais foram (i) apenas mitotano (30 mg) ou o (ii) mitotano (30 mg) acrescido de dieta enteral Trigliceril CM[®], composta por triglicerídeos de cadeia média. A formulação lipossomal foi desenvolvida neste trabalho e continha (iii) mitotano encapsulado em lipossomas. Um volume de 800 μL da suspensão lipossomas foi adicionado ao meio de incubação, correspondendo a 6,516 mg de mitotano.

4.4.1 Concentração de mitotano nos compartimentos

A concentração de mitotano foi determinada nos três compartimentos: o meio interno (porção permeada), meio externo e no segmento intestinal.

O mitotano presente nos segmentos intestinais de 7 cm foi extraído mediante adição de 1,5 mL de hexano e agitação em ultra-som. Em seguida, o extrato foi submetido ao preparo semelhante às amostras do meio interno e externo. Para análise por CLAE, a 250 µL do meio de incubação (ou do extrato, no caso dos segmentos intestinais) foram acrescidos 325 µL de acetona. Após agitação em vórtex e centrifugação, o sobrenadante foi mantido em repouso em congelador durante 8 – 12 horas e, em seguida, após retorno à temperatura ambiente, injetado em CLAE da marca Varian (bomba quaternária modelo 9012Q, detector ultravioleta fotodiodo modelo 9065, injetor automático modelo AI200). A corrida cromatográfica foi realizada em uma coluna Nucleosil C-18 (4,6 x 250 mm). A fase móvel, metanol-água 85:15 (v/v) foi dispensada a uma vazão de 1 mL/minuto. A detecção do mitotano foi realizada em UV a 239 nm.

Os dados mensuráveis foram analisados pelos testes estatísticos de análise de variância (ANOVA), modelos inteiramente casualizado e blocos casualizados, e do teste de Tukey. As análises foram realizadas pelo pacote estatístico Statistica 6.0 (StatSoft). A significância estatística foi considerada para $p < 0,05$.

4.4.2 Permeabilidade intestinal para os enantiômeros do mitotano

Para provar a especificidade na absorção do colesterol, WESTOVER e colaboradores (2006) marcaram o colesterol e o seu enantiômero sintético (ent-colesterol) com deutério, os dois foram administrados a *hamsters* por intubação intragástrica (gavagem) e medidos por espectrometria de massa. Os achados para a captação na mucosa intestinal e a recuperação nas fezes sugerem que a absorção do colesterol é estereosseletiva e parece ser mediada por proteínas celulares que possuem especificidade enantiomérica (WESTOVER, LIN, RIEHL et al., 2006).

Questionamentos referentes à absorção estereosseletiva podem ser postulados com relação aos enantiômeros do mitotano. Para investigar se há seletividade na permeação intestinal dos enantiômeros do mitotano, amostras do meio interno dos três grupos de

formulações em avaliação (mitotano, mitotano + TCM, mitotano encapsulado em lipossomas) foram submetidas à resolução dos enantiômeros por CLAE quiral com coluna de γ -ciclodextrina, conforme já descrito anteriormente.

4.5 Concentração plasmática do mitotano após administração oral crônica em ratos

4.5.1 Desenvolvimento e validação do método analítico (CG-CE)

Para desenvolvimento, validação e aplicação do método, foi utilizado um sistema para cromatografia em fase gasosa acoplado a um detector de captura de elétrons (CG-CE), marca Varian 3400, com injetor automático, com uma coluna apolar contendo CP-SIL 8CB (25 m x 0,15 mm x 0,12 μ m) e hidrogênio com gás carreador. Foi empregada uma rampa de temperatura iniciando em 80 ° C (1 minuto), com incrementos de 20 ° C/minuto até 300 ° C, que foi mantida por 10 minutos. O injetor foi mantido a 260 ° C e o detector, a 360 ° C. O método foi desenvolvido com base nos relatos de HERMANSSON et al., 2007.

3.5.1.1 Curva analítica, linearidade e efeito da matriz

Duas curvas analíticas foram construídas com cinco pontos com mitotano em concentrações de 0,5; 2,5; 5; 7,5; 10 ng/mL, em triplicata, preparados por diluição seriada a partir de uma solução de trabalho de 1 μ g/mL em hexano. As diluições foram realizadas com pipeta para microvolumes com medidas variáveis e balões volumétricos de 10 mL calibrados. Uma curva foi preparada em hexano e a outra, no extrato do plasma. Os pontos de cada curva (hexano e plasma) foram preparados e avaliados em triplicata.

O preparo da curva analítica em extrato do plasma está esquematicamente representado na Figura 13. Para obtenção do extrato do plasma, as proteínas plasmáticas foram precipitadas com acetona, pela mistura de 120 μ L de plasma de rato com 180 μ L de acetona, agitação em vórtex, centrifugação e secagem do sobrenadante com o auxílio de corrente de nitrogênio. Ao resíduo foi adicionado 1 mL de hexano, que foi aplicado em coluna de Florisil para extração em fase sólida. O eluato da extração em fase sólida foi levado à secagem, com corrente de nitrogênio e o resíduo foi fortificado com soluções de mitotano com concentração de 0,5; 2,5; 5; 7,5; 10 ng/mL.

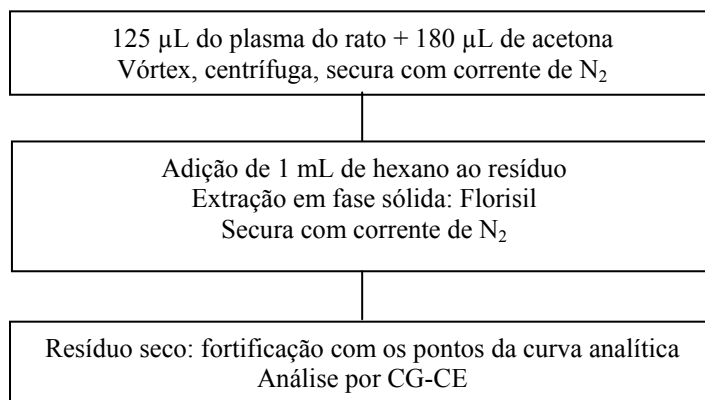


FIGURA 13 – OBTENÇÃO DO EXTRATO DO PLASMA E POSTERIOR PREPARO DOS PONTOS DA CURVA ANALÍTICA

O efeito da matriz é causado por substâncias co-extrativas que podem causar a perda ou o acréscimo do sinal cromatográfico, influenciando a quantificação dos compostos de interesse. Este efeito ocorre ao longo de todo o tempo da corrida cromatográfica. A preparação da amostra, com utilização de procedimentos de limpeza e gradiente de eluição, minimiza o efeito da matriz, porém não o elimina totalmente (KLOEPFER et al., 2005).

O efeito da matriz foi investigado mediante análise estatística dos resultados das curvas analíticas de mitotano, em hexano e no extrato do plasma. O teste “t” (Student) estatístico de significância foi utilizado para verificar se os coeficientes angulares das duas curvas são significativamente diferentes (INCQS, 2003).

3.5.1.2 Especificidade

Especificidade é a capacidade do método de avaliar um composto em presença de outras substâncias, como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

Para a avaliação da especificidade e/ou da seletividade do método, a investigação de interferentes foi realizada mediante análise de amostras de plasma branco, submetidas ao tratamento com acetona e, posteriormente, à extração em fase sólida.

3.5.1.3 Linearidade

A faixa linear de trabalho foi confeccionada a partir do limite de quantificação, utilizando cinco pontos previamente selecionados nas concentrações de 0,5; 2,5; 5; 7,5 e 10 ng/mL. A confirmação da faixa linear foi realizada pelo estudo da linearidade.

Para o estudo da linearidade, mediante diluições seriadas, os cinco pontos da curva analítica foram preparados a partir de uma solução estoque de mitotano de 1 µg/mL preparada em hexano (p/v). A análise foi realizada pela injeção dos cinco níveis, em triplicata, no CG-CE.

3.5.1.4 Precisão, exatidão e recuperação

A exatidão do método e a repetitividade (um parâmetro de precisão) foram determinadas através do estudo da recuperação do mitotano, fortificando dois níveis de quatro alíquotas de plasma branco de rato. Os níveis de fortificação foram de 1 ng/mL e 10 ng/mL. As amostras fortificadas foram submetidas à precipitação de proteínas plasmáticas com adição de acetona (125 µL de plasma + 180 µL de acetona) e purificadas através de extração em fase sólida. Posteriormente, foram injetadas no CG-CE para quantificação, com uma curva analítica de cinco pontos (0,5; 2,5; 5; 7,5 e 10 ng/mL). Para os dados referentes à recuperação, foram calculadas a recuperação média e o desvio padrão.

4.5.2 Avaliação da biodisponibilidade relativa

O protocolo do teste foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como confirmado pelo certificado 268 apresentado no anexo 2.

Três grupos de nove ratos machos, Wistar, pesando 350 g – 450 g, receberam uma dentre três diferentes formulações do mitotano, uma vez ao dia, durante 28 dias, por via oral, através de cânula metálica, acoplada a uma seringa, e intubação intragástrica. As três formulações testadas foram: (i) apenas mitotano (30 mg/Kg de peso corpóreo); (ii) mitotano (30 mg/Kg de peso corpóreo) acrescido de dieta enteral TCM (1 mL), composta por triglicerídeos de cadeia média ou (iii) mitotano encapsulado em lipossomas.

Um volume de 260 µL da suspensão lipossomas foi administrado a cada animal, correspondendo a 2,117 mg de mitotano.

Na formulação contendo TCM, 10 mg do mitotano foram misturados à 10 mL da dieta enteral. Em função da característica lipofílica do ativo, o uso concomitante de veículos oleosos aumenta a biodisponibilidade e, conseqüentemente, as concentrações plasmáticas (MOOLENAR et al., 1991). A dieta enteral Trigliceril CM[®], composta por

triglicerídeos de cadeia média (TCM), foi utilizada por ZANCANELLA et al. (2006) para a administração de mitotano a pacientes pediátricos.

Quando da administração de mitotano puro, 100 mg do fármaco foram dissolvidos em 10 mL de etanol 70 % (v/v), para administração de 1 mL a cada animal.

Cerca de 1 mL de sangue com anticoagulante heparina foi colhido, da cauda de cada animal, nos dias 0, 7, 14, 21 do experimento. O plasma foi separado por centrifugação e mantido congelado até a realização das análises.

Alíquotas de 120 µL de plasma (medidas com pipetas para microvolumes variáveis) foram misturadas a 180µL de acetona, agitadas em vórtex e centrifugadas. O sobrenadante foi separado e concentrado próximo da secura com o auxílio de fluxo de gás nitrogênio. O resíduo foi ressuscitado em 1 mL de hexano e aplicado em colunas para extração em fase sólida.

O método para limpeza do extrato das amostras de plasma, mediante extração em fase sólida, foi otimizado com o emprego de testes cujas principais variáveis foram a quantidade de Florisil, as condições para condicionamento da coluna e a composição do solvente extrator. Para otimização do método de limpeza, como referência, foi utilizado o Método 3620C (US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2000) e os relatos de outros autores (MANIRAKIZA et al., 2000; RODRIGUES et al., 2007; DÍEZ et al., 2006; RIVAS et al., 2007 e JIMENEZ TORRES et al., 2006).

Depois de submetidas à extração em fase normal, as amostras foram evaporadas até a secura com o auxílio de corrente de nitrogênio e aquecimento a 45 ° C, ressuscitadas com 1 mL de hexano e avaliadas por cromatografia em fase gasosa com detecção por captura de elétrons (CG-CE).

Os dados mensuráveis foram analisados pelos testes estatísticos de análise de variância (ANOVA), modelos inteiramente casualizado e blocos casualizados, e do teste de Tukey. As análises foram realizadas pelo pacote estatístico Statistica 6.0 (StatSoft). A significância estatística foi considerada para $p < 0,05$.

5 Resultados e Discussão

5.1 Determinação quiral do mitotano em plasma

Os enantiômeros do mitotano, separados, foram cedidos pelo prof. Cesar Costapinto Santana, do Laboratório de Separações da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp. A atividade ótica de cada enantiômero foi determinada em polarímetro, sendo que o menos retido corresponde ao (-)-mitotano, enquanto o mais retido é o (+)-mitotano. Adotando a determinação indireta utilizada por BÜSER e MÜLLER (1995) para a determinação da configuração absoluta do *R* e *S* mitotano, concluiu-se que o primeiro pico eluído corresponde ao *S*-(-)-mitotano, enquanto o mais retido é o *R*-(+)-mitotano.

O mitotano, na forma de comprimidos (Lisodren 500mg, Bristol Myers-Squibb), o padrão adquirido da *The United States Pharmacopeia* (USP) e o fármaco adquirido da Yick-Vic Chemicals & Pharmaceuticals (Hong Kong) são fornecidos como mistura racêmica, de acordo com experimentos realizados no leito simulado móvel do Laboratório de Separações da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP utilizando a coluna Kromasil CHI-TBB.

Para otimizar as condições para resolução dos enantiômeros do mitotano em plasma humano, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência e γ -ciclodextrina como fase estacionária quiral, foi realizado planejamento multifatorial dos experimentos. Solução da mistura racêmica (1 mg.mL^{-1}) preparada com a substância ativa obtida da *The United States Pharmacopeia* (USP), mediante diluição da solução estoque, foram utilizadas para fortificar plasma branco e avaliadas nas condições definidas no planejamento experimental fracionado 2^{4-1} (Tabela 6). Quatro fatores foram avaliados, em dois níveis, nomeadamente o solvente orgânico da fase móvel (metanol ou acetonitrila), a proporção entre solvente orgânico e água na fase móvel (85 % ou 75 % de solvente orgânico), o tampão (tampão fosfato ou acetato de trietilamônio) e o pH do tampão (4,5 ou 6,0). Quatro pontos médios foram analisados em triplicata (Tabela 6, amostras 9 a 23). A taxa de fluxo da fase móvel foi mantida em $0,8 \text{ mL.min}^{-1}$. Os resultados, apresentados na Tabela 6, foram avaliados em função da resolução (YEOLE et al., 2006), um parâmetro adimensional que expressa a separação entre dois picos, indicando a eficiência da separação cromatográfica entre compostos. A resolução é igual ou menor a 1 quando dois solutos são quase inseparáveis (COLLINS et al., 1997). Valores acima de 1,5 significam

que as duas substâncias têm uma separação até a linha de base (CIOLA, 1998). Resolução satisfatória dos enantiômeros foi observada apenas nas corridas nas quais foi empregado metanol-água 75:25 (v/v). Não foi observada influência do pH ou da natureza do tampão.

TABELA 6 – PLANEJAMENTO FATORIAL PARA DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO MITOTANO EM PLASMA HUMANO

| PLANEJAMENTO MULTIFATORIAL DE EXPERIMENTOS | | | | | | | |
|--|----------------|------------------------------|----------------|--------------|--------------------------------------|------------------|------------------|
| Variáveis e níveis | | | | | Parâmetros cromatográficos avaliados | | |
| Condições cromatográficas testadas | | | | | Resolução | Fator capacidade | |
| Amostra | Solvente | Concentração do solvente (%) | Tampão | pH do tampão | | (-)-(S)-mitotano | (+)-(R)-mitotano |
| 1 | Acetonitrila | 85 | TEAA | 4,5 | 0 | - | - |
| 2 | Metanol | 85 | TEAA | 6 | 0,3 | 4,19 | 4,46 |
| 3 | Metanol | 75 | TEAA | 6 | 1,3 | 9,51 | 10,95 |
| 4 | Acetonitrila | 75 | Fosfato | 6 | 0 | - | - |
| 5 | Metanol | 85 | Fosfato | 4,5 | 0,4 | 4,19 | 4,53 |
| 6 | Acetonitrila | 75 | TEAA | 4,5 | 0 | - | - |
| 7 | Acetonitrila | 85 | Fosfato | 6 | 0 | - | - |
| 8 | Metanol | 75 | Fosfato | 4,5 | 1,2 | 9,24 | 10,64 |
| 9 | Metanol | 80 | Fosfato | 5,2 | 0,8 | 5,97 | 6,68 |
| 10 | Metanol | 80 | Fosfato | 5,2 | 0,9 | 5,9 | 6,61 |
| 11 | Metanol | 80 | Fosfato | 5,2 | 0,9 | 5,92 | 6,64 |
| 12 | Acetonitrila | 80 | Fosfato | 5,2 | 0,8 | 5,92 | 6,61 |
| 13 | Acetonitrila | 80 | Fosfato | 5,2 | 0,8 | 5,88 | 6,55 |
| 14 | Acetonitrila | 80 | Fosfato | 5,2 | 0,8 | 5,93 | 6,63 |
| 15 | Metanol | 80 | TEAA | 5,2 | 0 | - | - |
| 16 | Metanol | 80 | TEAA | 5,2 | 0 | - | - |
| 17 | Metanol | 80 | TEAA | 5,2 | 0 | - | - |
| 18 | Acetonitrila | 80 | TEAA | 5,2 | 0 | - | - |
| 19 | Acetonitrila | 80 | TEAA | 5,2 | 0 | - | - |
| 20 | Acetonitrila | 80 | TEAA | 5,2 | 0 | - | - |

NOTA: TEAA – acetato de trietilamônio. NA – não avaliado.

Para realização dos experimentos previstos no planejamento fatorial, foi utilizada uma solução da mistura racêmica (1 mg.mL⁻¹) preparada com a substância ativa obtida da *The United States Pharmacopeia* (USP), mediante diluição da solução estoque, para fortificar o plasma branco e para avaliação em CLAE quiral com coluna de γ -CD e metanol-água 75:25 (v/v) a 0,8 mL.minuto⁻¹. A separação obtida está ilustrada na Figura

14. Para confirmar a ordem de eluição, soluções padrão dos enantiômeros separados foram avaliadas nas mesmas condições (Figura 15).

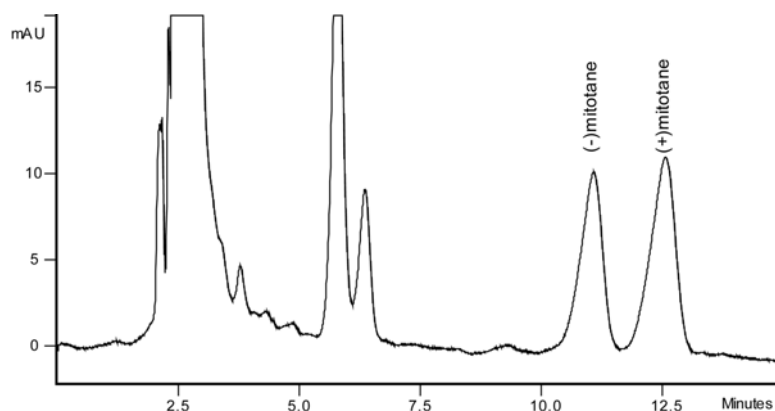


FIGURA 14 – CROMATOGRAMA DE PLASMA FORTIFICADO COM MITOTANO RACÊMICO
Condições: CLAE quiral, coluna de γ -CD, metanol-água 75:25 (v/v) acidificado a 0,8 mL/minuto

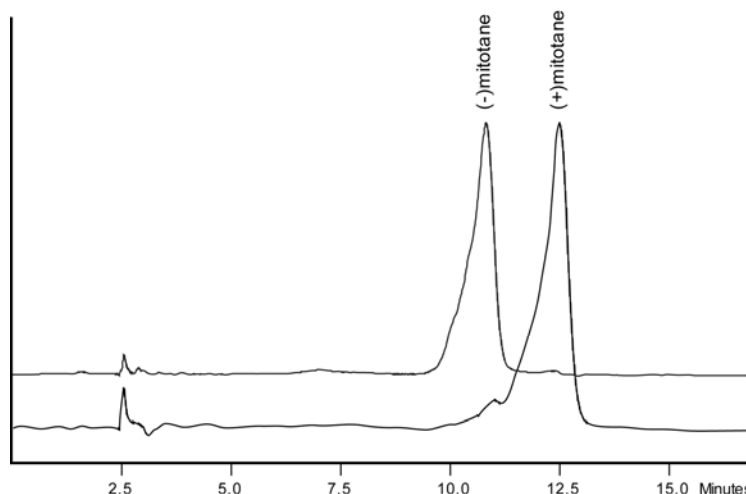


FIGURA 15 – CROMATOGRAMA OBTIDOS COM OS ENANTIÔMEROS DO MITOTANO SEPARADOS
Condições: CLAE quiral, coluna de γ -CD, metanol-água 75:25 (v/v) acidificado a 0,8 mL/minuto

Adotando a determinação indireta utilizada por BÜSER e MÜLLER (1995) para a determinação da configuração absoluta do *R* e do *S* mitotano, deduziu-se que o primeiro pico eluído corresponde ao *S*-(-)-mitotano. Para confirmar a ordem de eluição dos enantiômeros, no Laboratório de Separações da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, a coluna de γ -CD foi instalada a um cromatógrafo líquido preparativo, acoplado (em linha) a um equipamento de dicroísmo circular, que detecta o desvio do plano da luz polarizada. Uma solução de mitotano (mistura racêmica), 1 mg.mL⁻¹, foi avaliada

utilizando-se metanol-água 75:25 (v/v), com gotas de ácido fosfórico, como fase móvel, dispensada a $0,8 \text{ mL} \cdot \text{minuto}^{-1}$. Os compostos foram detectados em UV a 270 nm, acoplado ao cromatógrafo preparativo em fase líquida. Apesar da resolução não ter sido satisfatória (este não era o objetivo da análise), foi possível confirmar que o primeiro enantiômero eluído é *levo-rotatório* (-) (Figura 16).

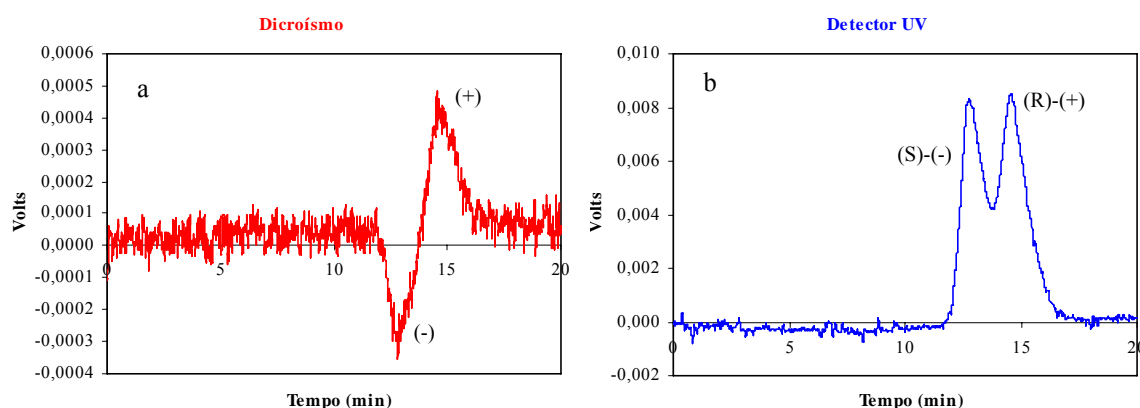


FIGURA 16 – ORDEM DE ELUIÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO MITOTANO E DESVIO DO PLANO DA LUZ POLARIZADA

(a) Análise dos picos através de dicroísmo circular. (b) Detecção através de UV.

Depois de otimizado o método, as amostras de plasma de cinco pacientes pediátricos, com CAC estadio IV, em tratamento com mitotano, obtidas de junho de 2003 a novembro de 2004, foram analisadas. Seguindo os preceitos da Resolução nº 196/1996, do Conselho Nacional de Saúde, que estabelece diretrizes e normas regulamentadoras para a realização de pesquisas envolvendo seres humanos, o projeto, sob o nº 1696, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos do Hospital Erasto Gaertner, Liga Paranaense de Combate ao Câncer, conforme carta de aprovação disponível no Anexo 2. A separação cromatográfica das formas (S) e (R) do mitotano no plasma dos pacientes foi obtida em uma coluna de γ -ciclodextrina, protegida por coluna de guarda de sílica C_{18} , usando metanol-água 75:25 (v/v), acidificada com ácido fosfórico, conforme cromatograma apresentado na Figura 17. Os resultados para cada paciente estão na Tabela 7, relacionados com o tempo de tratamento com mitotano, a concentração plasmática de mitotano e, para cada enantiômero, a área e a resolução entre os picos, além do excesso enantiomérico. Todas as separações em plasma de pacientes apresentaram resolução satisfatória.

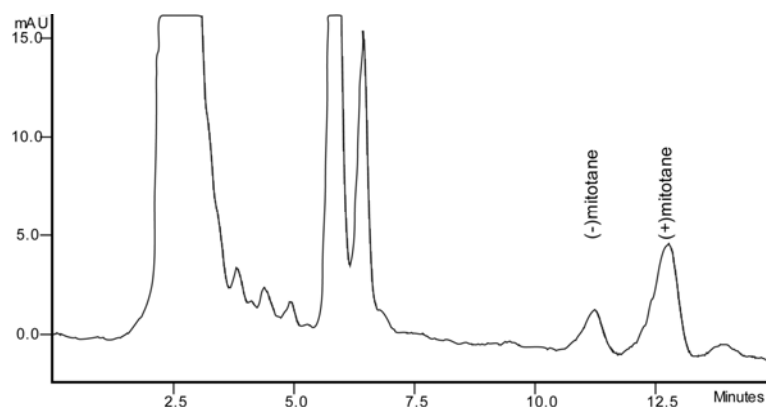


FIGURA 17 – CROMATOGRAMA EM CLAE UTILIZANDO γ -CD: RESOLUÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO MITOTANO EM PLASMA DE PACIENTE PEDIÁTRICO

O excesso enantiomérico existe quando um enantiômero está presente em maior proporção do que outro, em uma substância química quiral, pode ser calculado através da Equação 2, é definido como a diferença absoluta da fração molar de cada enantiômero e é expresso em porcentagem.

$$\%ee = \frac{(R - S)}{(R + S)} \times 100$$

ee = excesso enantiomérico
R = enantiômero majoritário
S = enantiômero minoritário

EQUAÇÃO 2 – CÁLCULO DO EXCESSO ENANTIOMÉRICO

TABELA 7 – RESULTADOS DA ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM FASE QUIRAL DO PLASMA DE PACIENTES

| PACIENTE | TRATAMENTO quinzenas | [] PLASM. µg/mL | 1º pico (-)-(S)-DDD Área % | 2º pico (+)-(R)-DDD Área % | RESOLUÇÃO | ee % |
|----------|-------------------------|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------|------|
| 1 | 20 | 5,9 | 25,1 | 74,9 | 3,2 | 69,0 |
| | 21 | 6,1 | 14,6 | 85,4 | 2,5 | 79,3 |
| | 23 | 8,0 | 7,2 | 92,8 | 2,2 | 84,8 |
| | 25 | 9,8 | 32,9 | 67,1 | 2,1 | 57,3 |
| | 27 | 11,4 | 17,3 | 82,7 | 2,4 | 71,3 |
| | 29 | 9,4 | 18,8 | 81,9 | 3,3 | 72,5 |
| | 31 | 15,1 | 15,0 | 85,0 | 2,2 | 69,9 |
| | 32 | 16,4 | 13,5 | 86,5 | 2,5 | 70,1 |
| | 33 | 19,8 | | 100,0 | | 80,2 |
| | 34 | 22,6 | 21,9 | 78,1 | 3,1 | 55,5 |
| | 34 | 18,6 | 15,5 | 84,5 | 3,0 | 65,9 |
| | 36 | 21,0 | 25,2 | 74,8 | 2,4 | 53,8 |
| | 37 | 20,7 | 16,1 | 80,7 | 2,1 | 60,0 |
| | 42 | 22,8 | 11,5 | 88,5 | 2,7 | 65,7 |
| 2 | 3 | 6,2 | 41,1 | 58,9 | 2,9 | 52,7 |
| | 6 | 8,3 | 24,6 | 75,4 | 2,9 | 67,1 |
| | 7 | 8,5 | 11,8 | 88,2 | 2,5 | 79,7 |
| | 9 | 20,7 | 19,7 | 80,3 | 2,3 | 59,6 |
| | 10 | 18,3 | 14,8 | 85,2 | 2,4 | 66,9 |
| | 11 | 13,8 | 18,6 | 84,4 | 2,3 | 70,6 |
| | 12 | 20,4 | 15,2 | 84,8 | 2,5 | 64,4 |
| | 13 | 7,9 | 18,4 | 81,6 | 3,0 | 73,7 |
| | 15 | 10,7 | 15,4 | 84,6 | 2,9 | 73,9 |
| | 16 | 20,1 | 8,8 | 85,9 | 2,6 | 65,8 |
| | 18 | 25,9 | 15,9 | 81,4 | 2,4 | 55,5 |
| 3 | 2 | 7,8 | 34,4 | 65,6 | 2,9 | 57,8 |
| | 4 | 9,9 | 8,7 | 91,3 | 2,8 | 81,4 |
| | 6 | 10,9 | 32,9 | 56,3 | 3,0 | 45,4 |
| | 9 | 7,6 | 33,9 | 66,1 | 2,3 | 58,5 |
| | 9 | 19,2 | 28,5 | 69,6 | 2,3 | 50,4 |
| | 16 | 20,8 | 27,3 | 58,9 | 2,7 | 38,1 |
| | 17 | 15,5 | 18,8 | 71,5 | 2,4 | 56,0 |
| | 18 | 9,8 | 27,0 | 63,8 | 2,4 | 54,0 |
| | 19 | 17,1 | 20,6 | 69,9 | 2,3 | 52,8 |
| 4 | 1 | 5,3 | 21,5 | 78,5 | 3,3 | 73,2 |
| | 3 | 10,8 | 14,8 | 85,2 | 2,9 | 74,4 |
| | 4 | 14 | 11,3 | 84,9 | 2,4 | 70,9 |
| | 7 | 19,6 | 8,5 | 91,5 | 2,7 | 71,9 |
| | 12 | 14,2 | 20,5 | 79,5 | 2,4 | 65,3 |
| 5 | 10 | 3,0 | 32,1 | 67,9 | 2,3 | 64,9 |
| | 12 | 2,5 | 32,1 | 67,9 | 2,3 | 65,4 |
| | 15 | 5,2 | 40,8 | 59,2 | 2,7 | 54,0 |
| | 17 | 6,8 | 24,7 | 75,3 | 2,6 | 68,5 |
| | 17 | 11,3 | 24,1 | 75,9 | 2,8 | 64,6 |
| | 20 | 10,2 | 6,4 | 93,6 | 2,6 | 83,4 |
| | 21 | 17,9 | 16,5 | 83,5 | 2,8 | 65,6 |
| | 30 | 21,4 | 5,7 | 94,3 | 2,4 | 72,9 |
| | 31 | 23,4 | 13,5 | 86,5 | 3,2 | 63,1 |

Conforme relatado na Tabela 7, as áreas dos picos dos dois enantiômeros foram medidas e o excesso enantiomérico foi calculado para todos os pacientes. Os resultados médios do excesso enantiomérico, para cada paciente, são apresentados na Figura 18. Exceto para o paciente # 2, as médias do excesso enantiomérico foram muito similares.

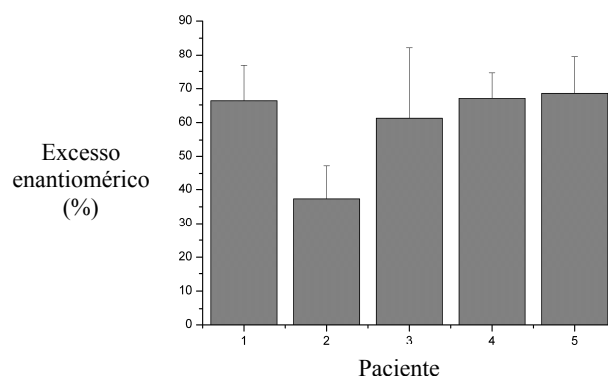


FIGURA 18 – EXCESSO ENANTIOMÉRICO MÉDIO PARA O (R)-(+)-MITOTANO NO PLASMA DOS PACIENTES EM TRATAMENTO COM A MISTURA RACÊMICA

O excesso enantiomérico (Figura 18) de cada paciente foi comparado com o tempo de tratamento, área de superfície corporal, índice de massa corporal e a concentração plasmática total do mitotano. O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado e não evidenciou nenhuma correlação para qualquer das variáveis avaliadas em qualquer paciente. Como exemplo da análise pelo coeficiente de correlação de Pearson, é apresentado o gráfico de dispersão da Figura 19 para o paciente # 1.

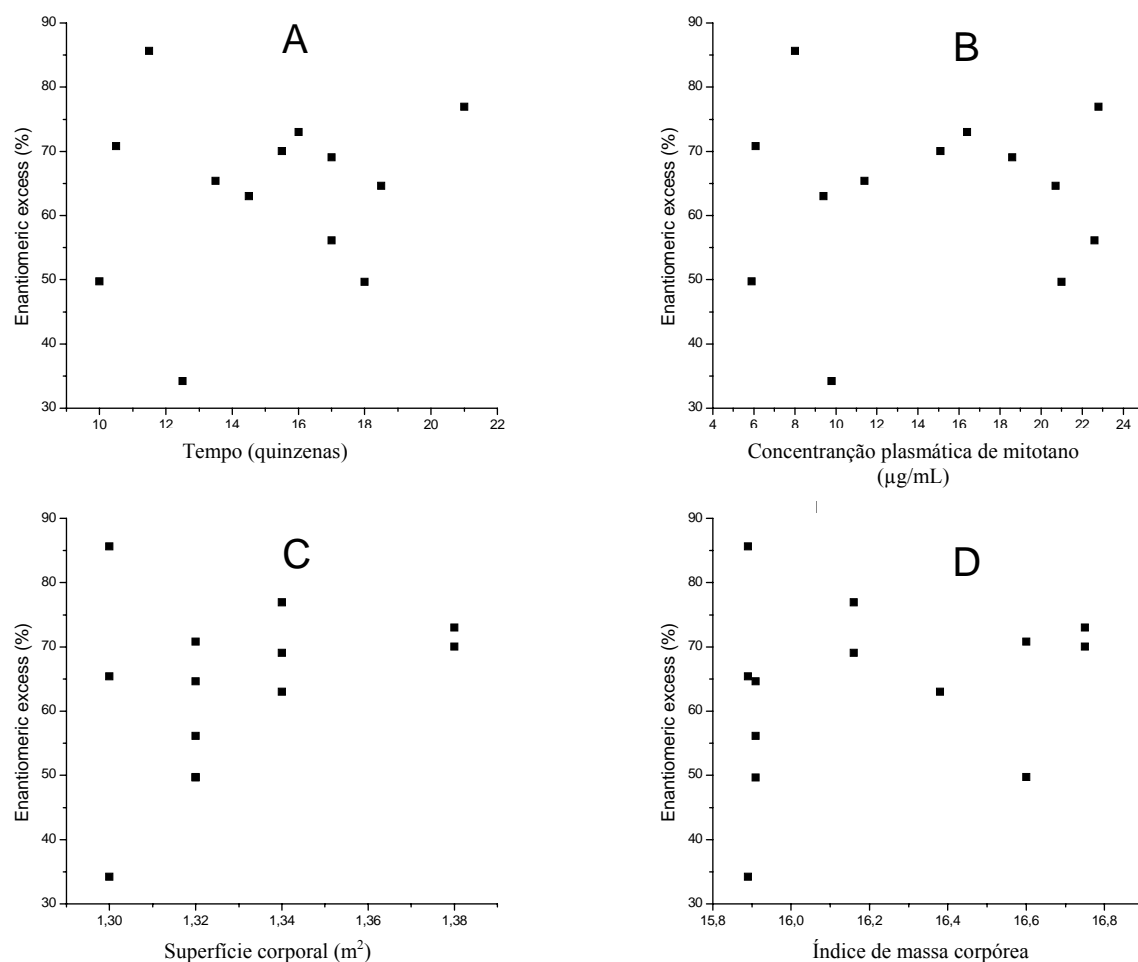


FIGURA 19 – GRÁFICOS DE DISPERSÃO PARA O EXCESSO ENANTIOMÉRICO DO (R)-(+)-MITOTANO PARA O PACIENTE # 1

(A) Excesso enantiomérico x tempo de tratamento. (B) Excesso enantiomérico x concentração plasmática de mitotano. (C) Excesso enantiomérico x superfície corporal. (D) Excesso enantiomérico x índice de massa corporal.

A partir destes resultados e considerando os relatos de LU (2007); LEVY, BODDY (1991); WANG, LU, CHAN (2000) e ALEKSA, ITO, KOREN (2006), acredita-se que os enantiômeros do mitotano são metabolizados em diferentes taxas, sendo mais rápidas para o (S)-(-)-mitotano. Deve-se, ainda, considerar a possibilidade de rotas metabólicas diferentes para cada enantiômero.

Acredita-se uma das etapas de metabolismo do mitotano envolve a formação do cloreto de ácido (o,p'-DDAC), o qual é tido como o intermediário reativo responsável pela atividade biológica (CAI et al., 1995). Este, por sua vez, pode ser rapidamente hidrolizado levando à formação do ácido correspondente, o ácido o,p-diclorodifenilacético, o qual é um dos principais metabólitos encontrados no sangue e na urina de pacientes. Outro

metabólito é o o,p-diclorodifenildicloroeteno (o,p'-DDE) também encontrado em altos teores em sangue de pacientes sob tratamento com mitotano.

A hipótese sugerida nesse trabalho é a de que cada enantiômero do mitotano tenha rotas metabólicas diferentes. Uma possibilidade é a de que um deles sofra uma hidroxilação inicial no carbono β , levando ao cloreto de ácido ativo e finalmente ao ácido o,p'-DDA. O outro enantiômero poderia sofrer hidroxilação inicial no carbono α , levando ao outro metabólito o,p'-DDE. Esta hipótese está resumida no esquema da Figura 20.

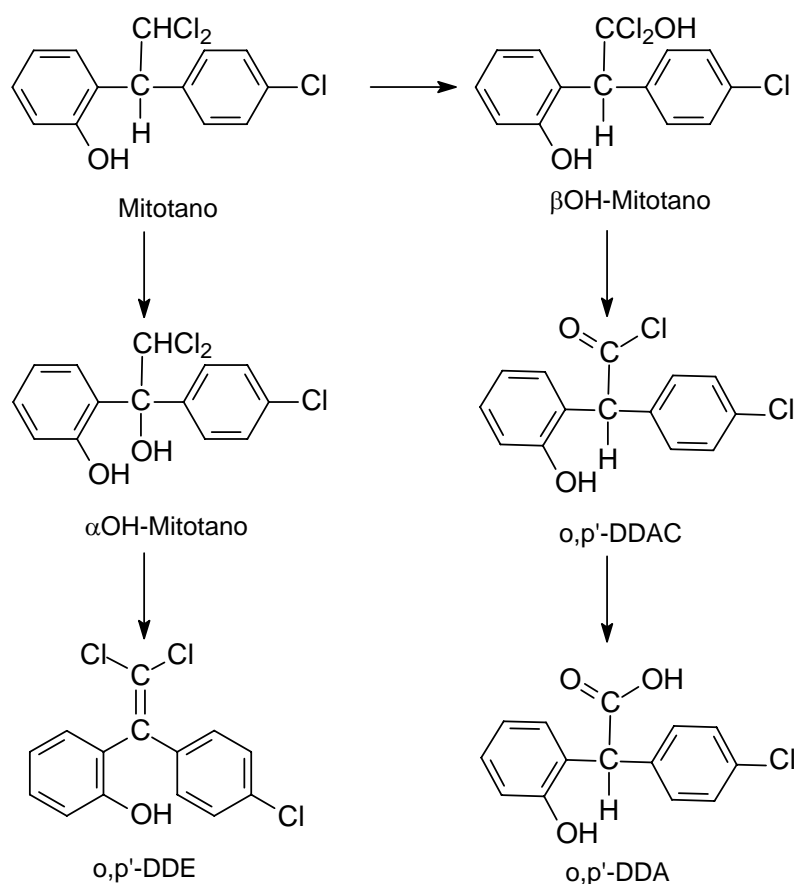


FIGURA 20 – HIPOTÉTICA ROTA METABÓLICA DOS ENANTIÔMEROS DO MITOTANO LEVANDO AOS DOIS PRINCIPAIS METABÓLITOS ENCONTRADOS EM HUMANOS

5.2 Encapsulação do mitotano em lipossomas

Para o preparo das formulações, foi utilizada a fosfatidilcolina de soja hidrogenada Lipoid SP C 3, obtida a partir da purificação da lecitina de soja, com massa molar aproximada de 790 g.mol^{-1} . O principal componente do fosfolípido SP C 3 é o 1,2-distearoil-fosfatidil colina. Este fosfolípido foi aprovado para uso oral e parenteral pelo

órgão de vigilância sanitária dos Estados Unidos, *Food and Drug Administration* (FDA), de acordo com informações do fabricante.

Inicialmente o mitotano foi incorporado ao fosfolipídio mediante secagem por atomização, com obtenção de partículas fosfolipídicas secas. Em seguida, a encapsulação do mitotano no fosfolipídio foi realizada mediante hidratação das partículas fosfolipídicas secas, com obtenção de vesículas. Destaca-se que não há, na literatura, até o momento, referências ao desenvolvimento de formulações lipossomais para o mitotano. Adicionalmente, deve-se considerar que este medicamento é especialmente utilizado por pacientes pediátricos; o comprimido é muito grande e para a ingestão da dose diária recomendada (4 g.m^{-2}) são necessários, normalmente, pelo menos 4 comprimidos.

5.2.1 Obtenção e caracterização das partículas fosfolipídicas secas

As partículas fosfolipídicas sólidas foram obtidas através de secagem por atomização. Três grupos de formulações foram preparados (Grupo A, Grupo B, Grupo C), conforme composições e componentes anteriormente descritos.

4.2.1.1 Rendimento da produção de partículas

O rendimento obtido na secagem por atomização para produção das partículas fosfolipídicas sólidas foi calculado utilizando-se a equação 1 e os resultados são apresentados na Tabela 8.

Não foi possível recuperar as partículas secas de mitotano (puro) após secagem por atomização devido ao seu reduzido tamanho e à eficiência do ciclone. Isto permite prever que, no preparo das formulações contendo mitotano, este será retido pelo ciclone apenas quando incorporado ao fosfolipídio.

Rendimentos relativamente baixos são característicos da obtenção de pequenas quantidades de pós na secagem por atomização e dependem da eficiência do ciclone em recolher o produto sólido, em função do tamanho das partículas. Um aumento no valor do rendimento é esperado quando bateladas maiores são produzidas e com o uso de ciclones com maior eficiência.

TABELA 8 – RENDIMENTO NA OBTENÇÃO DAS PARTÍCULAS FOSFOLIPÍDICAS SÓLIDAS

| FORMULAÇÕES | | | MASSA (g) | | RENDIMENTO % |
|-------------|----|-------------------|-----------|-------|-----------------|
| | | | INICIAL | FINAL | |
| | 1 | Controle mitotano | 3,336 | 0 | 0 |
| GRUPO A | 2 | Controle (L) | 3,336 | 1,581 | 47,39 |
| | 3 | L/M 1:1 | 4,696 | 2,103 | 44,78 |
| | 4 | L/M 2:1 | 8,032 | 4,063 | 50,58 |
| GRUPO B | 5 | Controle | 3,664 | 2,141 | 58,43 |
| | 6 | L/M 1:1 | 10,408 | 4,784 | 45,97 |
| | 7 | L/M 2:1 | 10,752 | 3,517 | 32,71 |
| GRUPO C | 8 | Controle | 1,976 | 0,512 | 25,91 |
| | 9 | L/M 1:0,25 | 4,835 | 0,812 | 16,80 |
| | 10 | L/M 1:1 | 5,392 | 0,829 | 15,38 |
| | 11 | L/M 2:1 | 4,672 | 0,301 | 6,45 |

NOTAS: massa inicial – antes da secagem por atomização; massa final – depois da secagem por aspersão.

4.2.1.2 Morfologia e cristalinidade

Para caracterização das partículas secas obtidas mediante secagem em *spray-drying*, cada formulação foi submetida à avaliação da morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e da cristalinidade por difratometria de raio-X.

Numa definição simples e concisa, cristais são arranjos atômicos ou moleculares cuja estrutura se repete numa forma periódica tridimensional. A cristalinidade de pós é função da umidade e do arranjo estrutural dos sólidos e pode ser avaliada através de difratogramas de raio-X. A cristalinidade das partículas secas é função da umidade e do arranjo estrutural dos sólidos e deve ser avaliada mediante análise de morfologia e de difratogramas de raio-X. Cada cristal possui um padrão único de difração, cuja análise permite sua caracterização. A análise de difratogramas de raio-X deve considerar a presença e o formato dos picos, sua intensidade e a largura da base.

De acordo com KIKUCHI et al. (1991), quanto mais amorfa for a estrutura sólida, mais facilmente ela é hidratada com soluções aquosas. Essa característica é desejável em partículas secas para uso farmacêutico devido à sua maior biodisponibilidade. Além do mais, a presença de manitol nas estruturas sólidas aumenta a eficiência da hidratação pelo aumento da área superficial dos lipídios. Entretanto, este efeito depende da incorporação total do manitol na matriz lipídica.

As Figuras 21 a 28 apresentam a morfologia ao MEV e os difratogramas de raio-X para os controles e para as formulações dos Grupos A, B e C.

A morfologia ao MEV e os difratogramas das Figuras 21 e 22 confirmam a cristalinidade do mitotano e do manitol. A Figura 21 mostra os cristais de mitotano ao MEV, confirmando o padrão indicado no difratograma apresentado na Figura 22.a.

Analisando-se os difratogramas apresentados nas Figuras 24, 26 e 28 para as formulações do Grupo A, B e C, respectivamente, pode-se afirmar que todas as formulações (controles e contendo a substância ativa) possuem padrões similares de cristalinidade que se assemelham ao fosfolipídio, componente majoritário.

Ao comparar a Figura 23.a (Controle do Grupo A), a Figura 25.a (Controle do Grupo B) e a Figura 27.a (Controle do Grupo C), nota-se que a inclusão do manitol provoca perda da esfericidade das partículas. Na Figura 25.a, formulação contendo fosfolipídio e 36 mM de manitol, é observada a presença de filme ao fundo. Na Figura 27.a, formulação contendo fosfolipídio e 92 mM de manitol, não são observadas partículas e há predominância de filme.

A Figura 23.a apresenta partículas esféricas com arranjo estrutural uniforme para o fosfolipídio puro (Controle do Grupo A), com diâmetro de $2,33 \pm 0,91 \mu\text{m}$, determinado no MEV. Já as Figuras 23.b (L/M 1:1) e 21.c (L/M 2:1) mostram que a adição da substância ativa alterou a morfologia das partículas, que não se apresentam como esferas homogêneas.

A Figura 25.a (Controle do Grupo B) apresenta poucas partículas e presença de filme lipídico. Nas Figuras 25.b e 24.c (L/M 1:1 e L/M 2:1, respectivamente), não há partículas homogêneas, com predominância de filme. Na presença do mitotano, não houve formação de partículas, apenas de filme.

Na Figura 27.a (Controle do Grupo C) não há partículas. Nas Figuras 27.d (L/M 2:1) e 27.e (L/M 3:1), curiosamente há presença de partículas. Já nas formulações L/M 1:0,25 (27.b) e L/M 1:1 observa-se apenas filme lipídico.

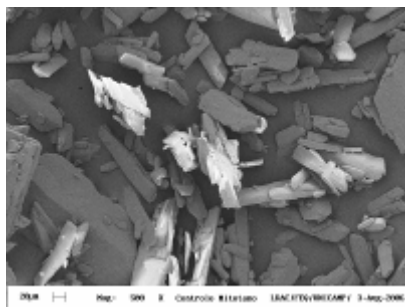


FIGURA 21 – MORFOLOGIA DO MITOTANO POR MEV
Aumento 500x

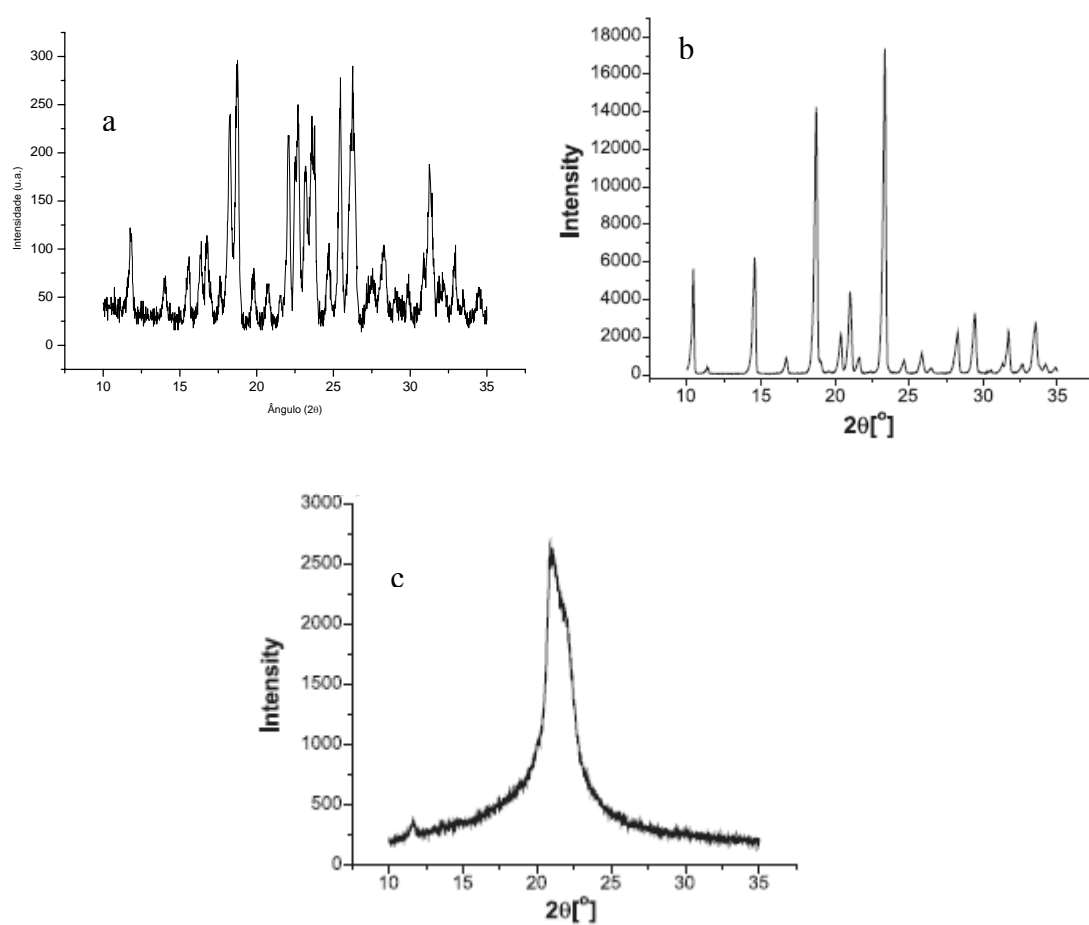


FIGURA 22 – DIFRATOGRAMA DO MITOTANO, DO MANITOL E DO FOSFOLIPÍDIO
(a) Mitotano; (b) Manitol e (c) Fosfolipídio. (a) e (b) foram obtidos de ALVES E SANTANA (2004)

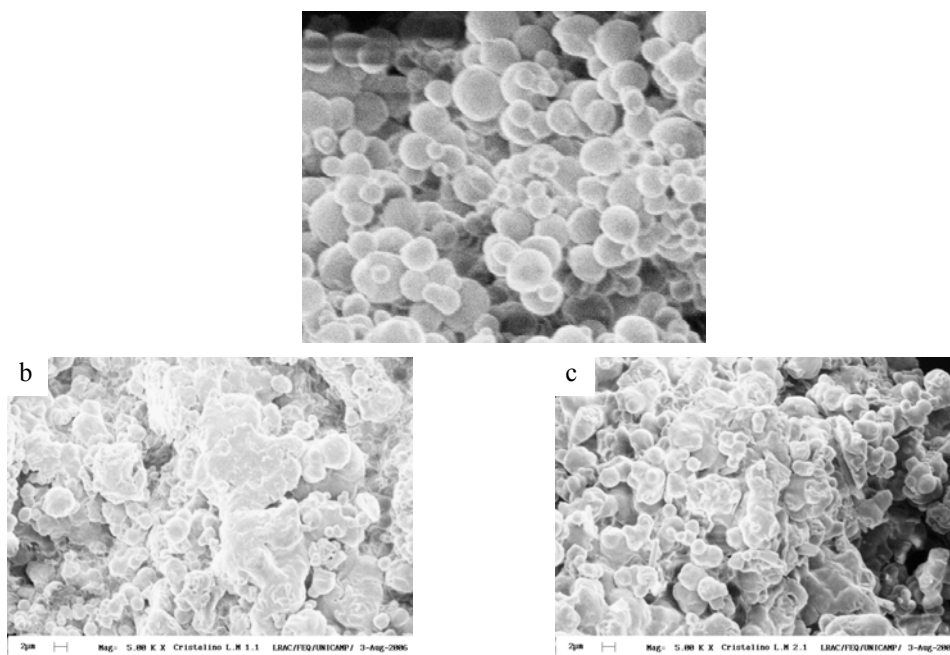


FIGURA 23 – MORFOLOGIA DAS PARTÍCULAS SECAS DAS FORMULAÇÕES DO GRUPO A
(a) Controle (L); (b) L/M 1:1; (c) L/M 2:1. Aumentos de 5000 x.

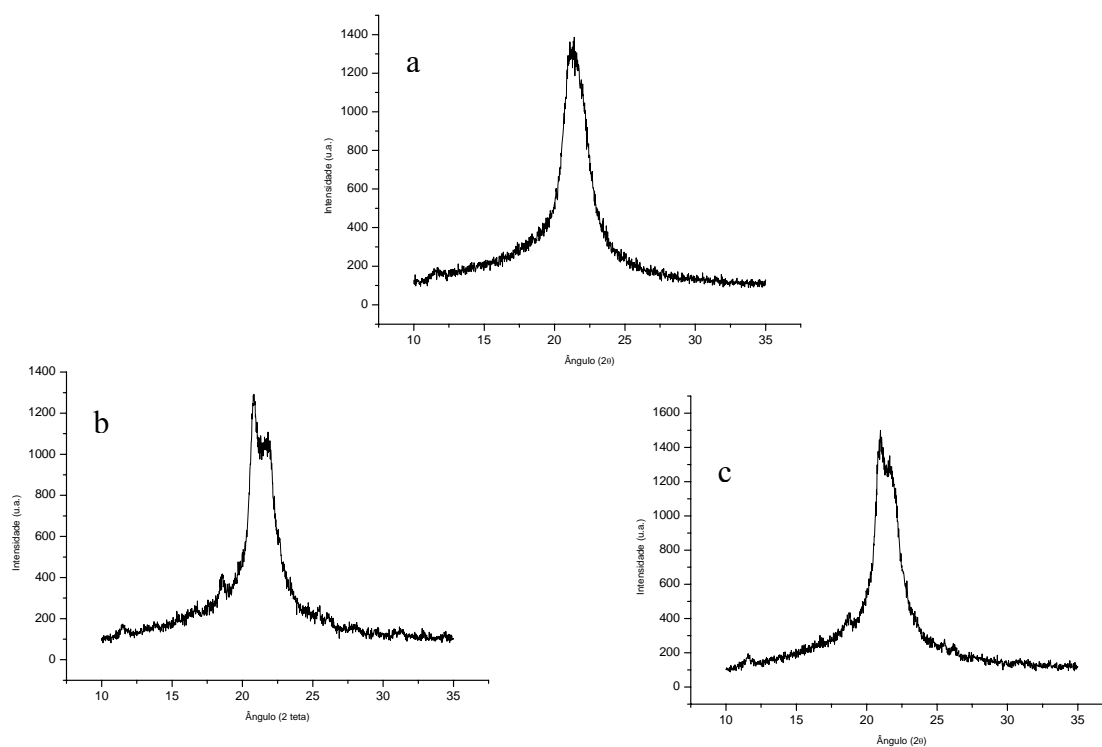


FIGURA 24 – DIFRATOGRAMAS DAS FORMULAÇÕES DO GRUPO A
(a) Controle (L); (b) L/M 1:1; (c) L/M 2:1

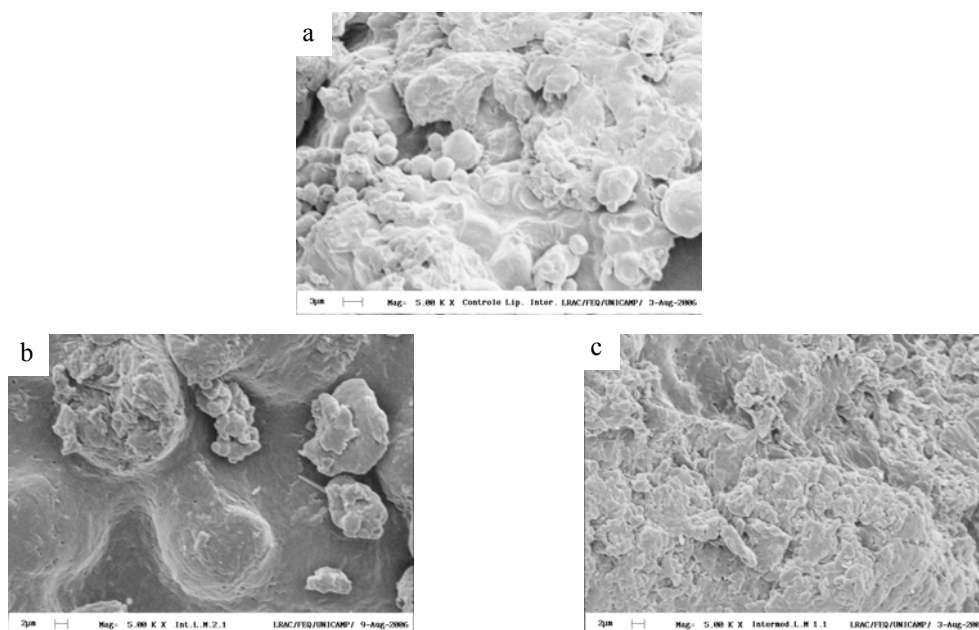


FIGURA 25 – MORFOLOGIA DAS PARTÍCULAS SECAS DAS FORMULAÇÕES DO GRUPO B Controle; (b) L/M 1:1; (c) L/M 2:1. Aumentos de 5000 x.

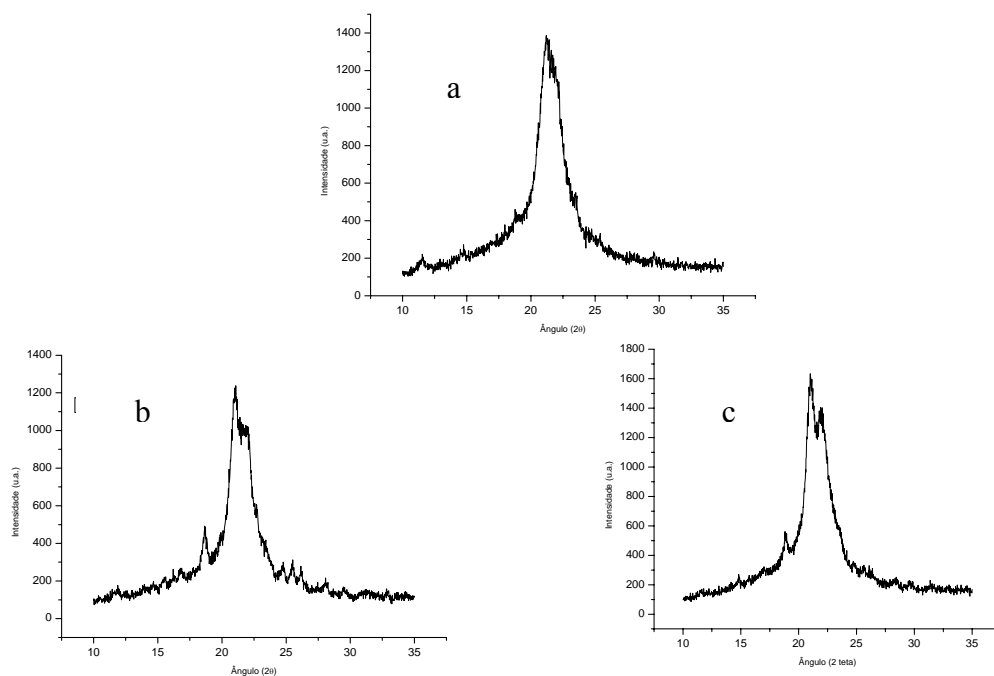


FIGURA 26 – DIFRATOGRAMAS DAS FORMULAÇÕES DO GRUPO B Controle; (b) L/M 1:1; (c) L/M 2:1

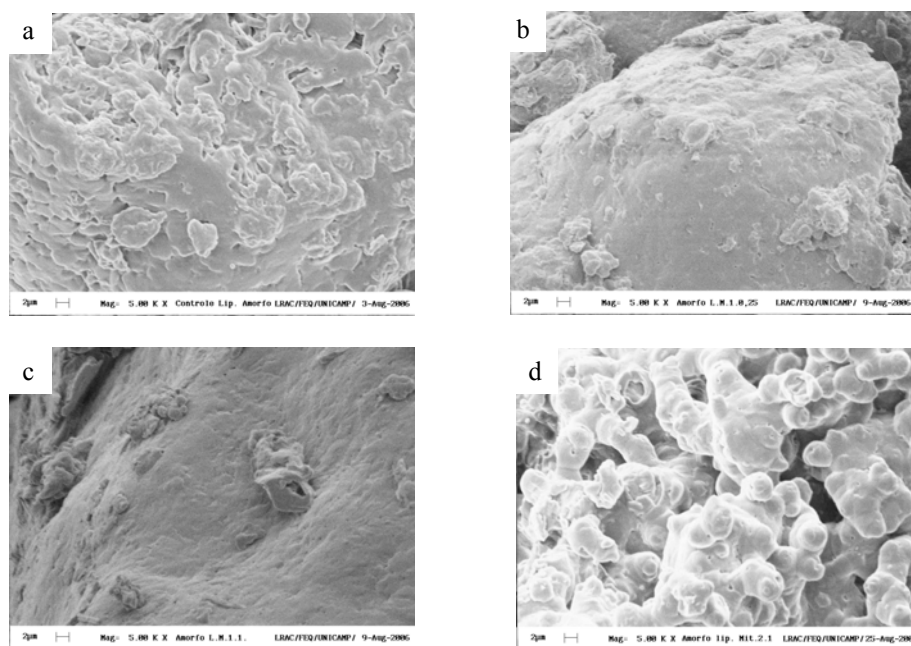


FIGURA 27 – MORFOLOGIA DAS PARTÍCULAS SECAS DAS FORMULAÇÕES DO GRUPO C (a) Controle; (b) L/M 1:0,25; (c) L/M 1:1; (d) L/M 2:1. Aumentos de 5000 x.

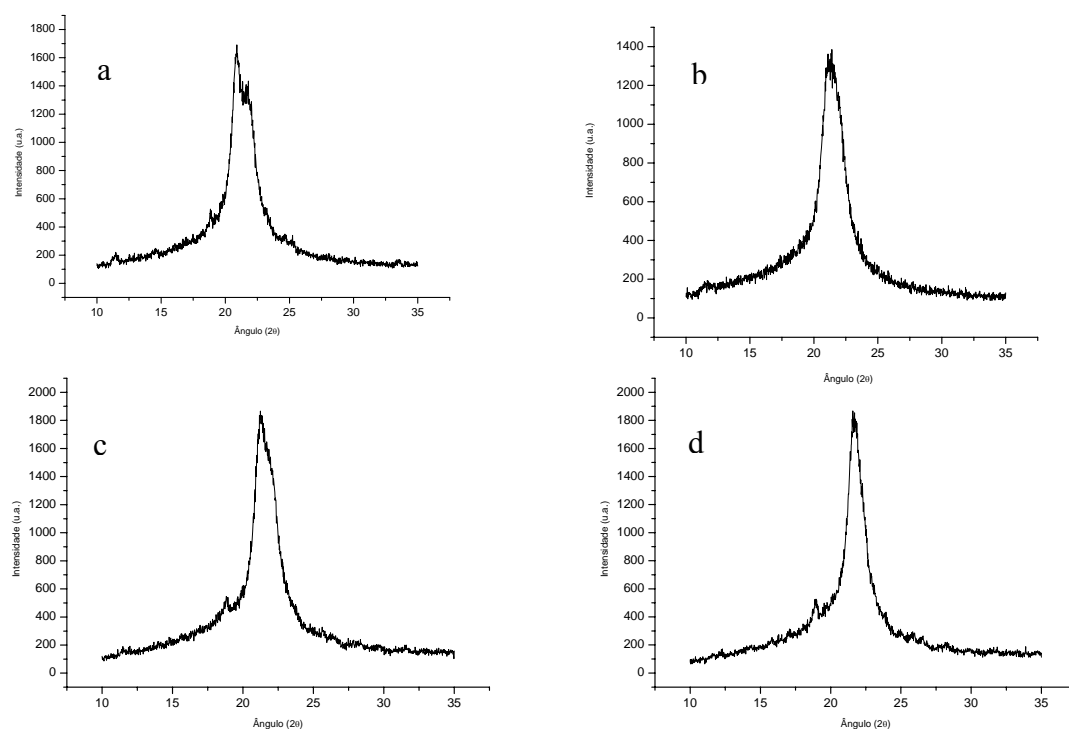


FIGURA 28 – DIFRATOGRAMAS DAS FORMULAÇÕES DO GRUPO C (a) Controle; (b) L/M 1:0,25; (c) L/M 1:1; (d) L/M 2:1.

As análises da morfologia e da cristalografia são empregadas na caracterização das formulações, mas não fornecem subsídios para a sua aceitação ou rejeição.

5.2.2 Obtenção e caracterização dos lipossomas

4.2.2.1 Diâmetro médio e distribuição de tamanho

Os diâmetros hidrodinâmicos médios e a distribuição de tamanho dos lipossomas determinados mediante espectroscopia de correlação de fótons são apresentados na Tabela 9. Na espectroscopia de correlação de fótons, um *laser* é incidido sobre as partículas e seu tamanho é estimado pela reflexão do *laser* e pelo movimento browniano das partículas.

TABELA 9 – DIÂMETRO HIDRODINÂMICO MÉDIO E DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS FORMULAÇÕES

| FORMULAÇÃO | | | Nº PICOS | DIÂMETRO nm |
|------------|----|-------------------|----------|------------------------------|
| | 1 | Controle mitotano | - | - |
| GRUPO A | 2 | Controle (L) | 1 | 1238,1 |
| | 3 | L/M 1:1 | 1 | 1190,3 |
| | 4 | L/M 2:1 | 1 | 1005,8 |
| GRUPO B | 5 | Controle | 1 | 1591,9 |
| | 6 | L/M 1:1 | 1 | 969,9 |
| | 7 | L/M 2:1 | 1 | 795,3 |
| GRUPO C | 8 | Controle | 1 | 1701,5 |
| | 9 | L/M 1:0,25 | 1 | 1915 |
| | 10 | L/M 1:1 | 2 | 1194,5 (84%) 3655,7 (16%) |
| | 11 | L/M 2:1 | 1 | 1337,5 |

Dentre as formulações do Grupo A, observa-se que L/M 2:1 possui o menor diâmetro hidrodinâmico. A inclusão do fármaco mitotano nas formulações do Grupo B levou a uma redução no diâmetro hidrodinâmico. Dentre as formulações do Grupo C, os maiores diâmetros hidrodinâmicos coincidem com as maiores proporções de fosfolípido, com provável formação de agregados no L/M 1:1 (partículas com diâmetro hidrodinâmico maior que 3000 nm).

O tamanho das vesículas tem impacto na biodisponibilidade e na farmacocinética, já que está relacionado à captação pelo sistema fagocitário mononuclear (ou retículo endoplasmático), presente no fígado, baço, medula óssea, entre outros tecidos, que retiraria as vesículas do sistema circulatório, quando a substância ativa seria liberada ao longo do

tempo (KUMI, 2001). Os lipídios, como excipientes, também podem ser digeridos e dispersados no trato gastrointestinal, liberando o ativo (CHEN, 2007).

MANISHA, LABHASETWAR, AMIDON, LEVY (1996) investigaram o efeito do tamanho de micropartículas na captação pelo tecido gastrointestinal. Os autores prepararam partículas de polímero biodegradável (poli-ácido-lático e poli-ácido-glicólico 50:50) com diâmetro em torno de 100 nm, 500 nm, 1 µm e 10 µm encapsulando albumina bovina, e a eficiência de captação foi quantitativamente analisada mediante modelo de alça intestinal *in situ* (ensaio *in vitro*). A captação de micropartículas com 100 nm de diâmetro foi significativamente maior quando comparado com todos os tamanhos de partículas, considerando o número de partículas e a massa total. O número de micropartículas com 100 nm por mm² do duodeno é $2,7 \times 10^9$, enquanto o número para 1 µm é $1,3 \times 10^5$. No íleo, o número de micropartículas com 100 nm.mm⁻² é $4,4 \times 10^9$ e $6,5 \times 10^5$ para partículas com 1 µm. No exame histológico, micropartículas com 100 nm estiveram distribuídas nas camadas submucosas, enquanto as partículas maiores estiveram, na sua maioria, alinhadas no epitélio.

Lipossomas da ordem de 1 µm, como os obtidos neste trabalho, são limitantes quando administrados por via parenteral, pelo risco de obstrução de vasos sangüíneos. Como todas as formulações da Tabela 9 possuem diâmetro em torno de 1 µm, o tamanho não foi considerado como um critério de exclusão.

Mesmo que outros autores (TROTTA et al., 2001) tenham preparado nanossuspensões de mitotano com diâmetro de 100 nm, acredita-se que as formulações lipossomais com diâmetros em torno de 1 µm possam contribuir para implementar a permeação intestinal e a biodisponibilidade do mitotano por alterações no coeficiente de partição.

4.2.2.2 Concentração de fosfolipídios

A quantificação de fosfolipídios é importante para investigar se houve perda diferencial entre os componentes de cada formulação e para a estimativa, por método indireto, da concentração de mitotano em cada formulação.

A concentração de fosfolipídios nas partículas secas foi determinada pelo teor de fosfato, na qual o material orgânico é submetido à digestão ácida e o composto azul gerado foi detectado e quantificado por espectrofotometria de UV a 830 nm. Uma curva analítica com cinco concentrações conhecidas de fosfato foi construída, com coeficiente de

linearidade de $R = 0,9979$. A concentração de fosfato nas formulações, antes e após a secagem por atomização, é apresentada na Tabela 10. Cada formulação foi analisada, para a concentração de fosfato, em triplicata.

TABELA 10 – CONCENTRAÇÃO DE FOSFATO NAS FORMULAÇÕES, ANTES E APÓS A SECAGEM POR ATOMIZAÇÃO

| FORMULAÇÕES | | | CONCENTRAÇÃO DE FOSFATO mM | |
|-------------|----|------------|----------------------------|-------|
| | | | INICIAL | FINAL |
| | 1 | Mitotano | - | - |
| GRUPO A | 2 | Controle | 85 | 65,9 |
| | 3 | L/M 1:1 | 170 | 91,6 |
| | 4 | L/M 2:1 | 170 | 85 |
| GRUPO B | 5 | Controle | 85 | 77,3 |
| | 6 | L/M 1:1 | 85 | 56,6 |
| | 7 | L/M 2:1 | 170 | 83 |
| GRUPO C | 8 | Controle | 90 | 79,9 |
| | 9 | L/M 1:0,25 | 90 | 79,4 |
| | 10 | L/M 1:1 | 90 | 92 |
| | 11 | L/M 2:1 | 180 | 83,9 |

NOTAS: concentração de fosfato inicial – antes da secagem por atomização; concentração de fosfato final – depois da secagem por atomização.

4.2.2.3 Proporção molar fosfolipídio/mitotano por determinação indireta

Considerando a massa inicialmente utilizada na secagem por atomização e as concentrações molares de fosfolipídio determinadas pelo ensaio fosfato, foi possível estimar, indiretamente, a concentração molar de mitotano em cada formulação, bem como a relação molar fosfolipídio/mitotano (L/M), conforme apresentado na Tabela 11.

Especialmente para as formulações do Grupo B e C, as determinações indiretas da concentração de mitotano e da relação molar fosfolipídio/mitotano (L/M) são uma estimativa, já que, apesar de minoritária, há a massa de manitol que não está sendo considerada ou descontada.

TABELA 11 – DETERMINAÇÃO INDIRETA DA CONCENTRAÇÃO DE MITOTANO E RELAÇÃO MOLAR FOSFOLIPÍDIO/MITOTANO

| FORMULAÇÕES | | Lipídio mM | Massa inicial g | Massa final g | Lipídio mM | Lipídio g | Mitotano g | Mitotano mM | RELAÇÃO MOLAR L/M |
|-------------|---------------------|---------------|-----------------------|---------------------|---------------|--------------|---------------|----------------|-------------------------|
| GRUPO A | 1 Controle mitotano | - | 3,34 | 0 | 0 | 0 | 0,00 | 0,0 | - |
| | 2 Controle (L) | 85 | 3,34 | 1,58 | 65,9 | 1,55 | - | - | - |
| | 3 L/M 1:1 | 170 | 9,39 | 2,10 | 91,6 | 2,16 | NÃO | NÃO | - |
| | 4 L/M 2:1 | 170 | 8,03 | 4,06 | 85 | 2,00 | 2,06 | 6,4 | 13,2 |
| GRUPO B | 5 Controle | 85 | 3,66 | 2,14 | 77,3 | 1,82 | - | - | - |
| | 6 L/M 1:1 | 85 | 10,41 | 4,78 | 56,6 | 1,33 | 3,45 | 10,8 | 5,2 |
| | 7 L/M 2:1 | 170 | 10,75 | 2,32 | 83 | 1,95 | 0,37 | 1,2 | 71,9 |
| GRUPO C | 8 Controle | 180 | 1,98 | 1,54 | 79,9 | 1,88 | - | - | - |
| | 9 L/M 1:0,25 | 180 | 4,84 | 2,44 | 79,4 | 1,87 | NÃO | NÃO | - |
| | 10 L/M 1:1 | 180 | 5,39 | 0,83 | 46 | 1,08 | NÃO | NÃO | - |
| | 11 L/M 2:1 | 180 | 4,67 | 0,30 | 83,9 | 1,98 | NÃO | NÃO | - |

NOTA: Relação molar L/M (fosfolipídio/mitotano)

A partir da determinação quantitativa de fosfolipídios e da diferença mássica entre lipídios e mitotano, os resultados indicaram, para a formulação L/M 2:1 do Grupo A, uma proporção fosfolipídio e mitotano 13,2/1 (mM/mM). Para as formulações intermediárias, não foi determinada nem descontada a massa do manitol, portanto, as proporções molares apresentadas são apenas estimativas. Já para as formulações do Grupo C, a diferença de massas indica que não houve encapsulação do mitotano. Desta forma, selecionou-se para a realização dos testes *in vitro* e *in vivo* a formulação L/M 2:1 do Grupo A.

4.2.2.4 Determinação da eficiência de encapsulação e da concentração total de mitotano

Lipossomas contendo o fármaco encapsulado foram separados da fração de mitotano livre por migração diferencial das populações, em função da densidade, em camadas com diferentes concentrações de sacarose. A eficiência da encapsulação foi determinada pela separação do ativo não encapsulado por migração diferencial em gradiente de sacarose (NEW, 1990) e posterior quantificação das camadas por CLAE.

Os ensaios com gradiente de sacarose, para separação do mitotano não encapsulado, foram realizados com a formulação escolhida para os testes *in vitro* e *in vivo*, L/M 2:1 do Grupo A. Para investigação quanto à presença de possíveis interferentes, a formulação Controle, contendo apenas fosfolipídio, também foi avaliada.

Os gradientes de sacarose (b) e (c) da Figura 10 não apresentaram separação visual em camadas, não tendo sido eficientes na separação do mitotano não encapsulado. Por este motivo, apenas as camadas superior e inferior do gradiente descontínuo (a) foram submetidas à avaliação do tamanho das partículas, por espectroscopia de correlação de fótons e determinação da concentração de mitotano por CLAE, conforme descrito na Tabela 12.

TABELA 12 – GRADIENTE DE SACAROSE PARA SEPARAÇÃO DO MITOTANO NÃO ENCAPSULADO

| GRADIENTE SACAROSE | FORMULAÇÃO | CAMADAS | DIÂMETRO PARTÍCULAS nm | QUANTIFICAR MITOTANO? | ANÁLISE POR CLAE |
|--------------------|----------------------|----------|------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| (a) 15%; 50% | (4) L/M 2:1, Grupo A | Superior | 659,5 | Sim | Abaixo da sensibilidade do método |
| | | Inferior | 1006,5 | Não | - |

Para análise por CLAE, volumes iguais da porção superior do gradiente de sacarose, para as formulações Controle e L/M 2:1, foram misturados com hexano para extração líquido-líquido; a extração foi repetida três vezes. Após evaporação do hexano, o resíduo foi ressuspensionado com acetona (575 µL) e avaliado em CLAE com coluna de sílica C18, fase móvel metanol-água 85:15 (v/v) e detecção no ultravioleta a 239 nm.

Não foi observada a presença de mitotano na porção superior da formulação L/M 2:1, cujo resultado é expresso como abaixo da sensibilidade do método (5 µg.mL⁻¹). Desta forma, a eficiência de encapsulação foi considerada 100 %. Este é um resultado sensato, considerando a baixa solubilidade do mitotano em água (0,1 mg.L⁻¹, a 25° C) e, conseqüentemente, a tendência em permanecer associado aos lipídios e não disperso na fase aquosa.

Considerando a quantificação total de mitotano após a hidratação e a eficiência de encapsulação, pode-se concluir que há 25,45 mM de mitotano encapsulados em 85 mM do fosfolipídio, na formulação L/M 2:1 do Grupo A. Inicialmente a formulação foi preparada com uma proporção de lipídio e mitotano 2:1 (M/M). Após secagem em *spray drying* e hidratação, a razão fosfolipídio/mitotano alterou-se para 3,34:1 (M/M).

Esse resultado indica que realmente houve incorporação do mitotano na matriz lipídica durante a secagem por atomização, e que todo o mitotano incorporado nas partículas secas foi encapsulado nos lipossomas após hidratação. Compostos altamente hidrofóbicos, como o mitotano, apresentam concentrações muito baixas quando encapsulados em lipossomas através dos métodos convencionais. A incorporação prévia na matriz lipídica através da secagem mostrou-se um processo promissor para a encapsulação do mitotano em lipossomas, com as vantagens adicionais de ser um processo escalonável e de proporcionar estabilidade das partículas durante a estocagem.

Na etapa de secagem, a perda do fosfolipídio foi de 50 % da massa inicial, enquanto a perda de mitotano foi de 70,6 % da massa inicial. A perda desigual dos componentes é razoável quando se considera que (i) o rendimento da secagem no *spray drying* depende do tamanho das partículas e da eficiência do ciclone em recolhê-las; (ii) o mitotano tem partículas menores do que o fosfolipídio, sendo recuperadas pelo ciclone, na secagem por atomização, somente aquelas associadas ou incorporadas à matriz de fosfolipídio e (iii) as partículas muito finas do mitotano livre são perdidas para a atmosfera após secagem no *spray drying*. Essas perdas podem ser reduzidas expressivamente, utilizando equipamentos de *spray drying* com ciclones de eficiências mais elevadas, que é o caso de equipamentos mais modernos já disponíveis comercialmente.

5.3 Estudo comparativo da permeabilidade intestinal do mitotano

5.3.1 Concentração de mitotano nos compartimentos

O ensaio avalia a permeação de fármacos ao longo de segmentos intestinais imediatamente retirados de ratos vivos, com manutenção da atividade biológica ótima por até 2 horas mediante o uso de TC 199, que é um meio de cultivo para células, a 37 °C, para simular a temperatura do organismo, e sob agitação constante, que simula a homogeneização que ocorreria devido aos movimentos peristálticos. Este sistema é utilizado para verificar a captação de lipossomas, proteínas e macromoléculas que podem ser utilizadas no desenvolvimento de sistema para administração oral de fármacos (BARTHE et al., 1998; HE et al., 1998; BARTHE et al., 1999). O objetivo do ensaio foi avaliar, comparativamente, a taxa de permeação do mitotano, nas diferentes formulações, sendo duas convencionais e uma formulação lipossomal desenvolvida nesse trabalho. A permeação do mitotano presente na formulação lipossomal L/M 2:1, do Grupo A,

desenvolvida nesse trabalho, foi comparada com a permeação obtida com duas formulações convencionais pelo ensaio do intestino invertido.

O protocolo do teste foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como confirmado pelo certificado 268 apresentado no anexo 1.

A curva analítica para determinação do mitotano no meio de incubação TC 199 foi construída com sete pontos (5 µg/mL; 25 µg/mL; 50 µg/mL; 500 µg/mL; 1 mg/mL; 5 mg/mL; 10 mg/mL), analisados em triplicata, apresentando coeficiente de correlação de 0,9998.

Para avaliação da presença de possíveis interferentes, amostras do meio externo, interno e do segmento intestinal do controle (branco) foram submetidas ao preparo com acetona, como já descrito anteriormente, e avaliadas por CLAE. Não foram evidenciados interferentes no mesmo tempo de retenção do mitotano.

Nos ensaios de permeação utilizando as formulações convencionais, 30 mg do fármaco foram adicionados ao meio de incubação, misturados ou não à dieta enteral Trigliceril CM[®]. Em função da característica lipofílica do ativo, o uso concomitante de veículos oleosos aumenta a biodisponibilidade e, conseqüentemente, as concentrações plasmáticas (MOOLENAR et al., 1981). A dieta Trigliceril CM[®] foi utilizada por ZANCANELLA et al. (2006) para a administração de mitotano a pacientes pediátricos. A formulação lipossomal contendo mitotano foi desenvolvida neste trabalho. Um volume de 800 µL da suspensão lipossomas foi adicionado ao meio de incubação, correspondendo a 6,516 mg de mitotano. A dose de mitotano na forma lipossomal é cerca de cinco vezes inferior do que nas formulações convencionais utilizadas como referência.

A porcentagem da massa total de mitotano adicionada ao experimento foi determinada, por CLAE, no meio interno (substância ativa permeada), meio externo (quantidade não permeada) e segmento intestinal, conforme respectivamente demonstrado nas Figuras 29, 30 e 31. As barras indicam o desvio padrão (DP).

A permeação de mitotano pelo duodeno em 120 minutos foi de 3,8; 10 e 44,8 % da massa total adicionada, respectivamente, para o mitotano (puro); mitotano acrescido da dieta enteral TCM e formulação lipossomal (Figura 29), indicando alteração na permeação intestinal para a forma lipossomal, provavelmente devido à alteração do coeficiente de partição octanol-água. Deve-se ressaltar que a dose de mitotano utilizada no teste com os lipossomas é cerca de 5 vezes menor do que a dose das formulações convencionais (mitotano puro ou misturado ao TCM).

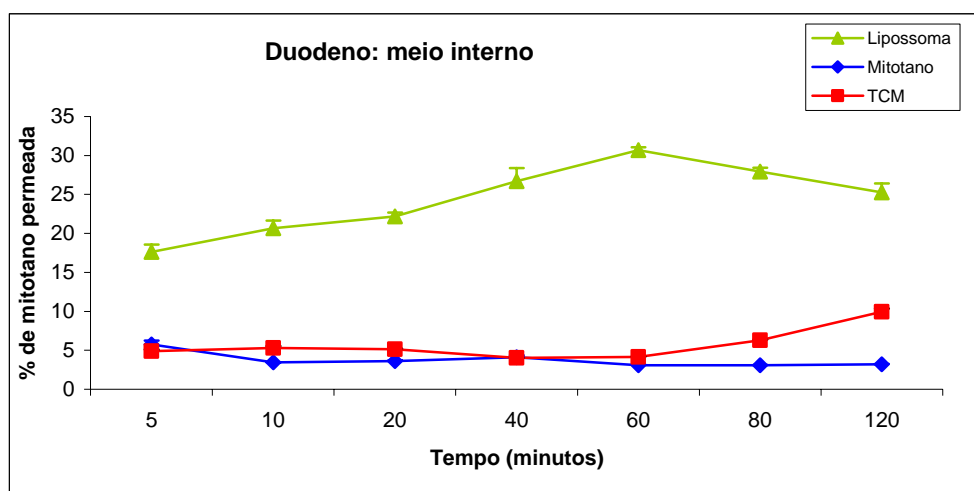


FIGURA 29 – MEIO INTERNO: PERMEACÃO DO MITOTANO NAS DIFERENTES FORMULAÇÕES

Ao longo dos tempos do ensaio, há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as taxas de mitotano permeadas (para o meio interno) na formulação lipossomal, quando comparada com as formulações padrão. Isto indica que melhores taxas de permeação foram obtidas com a formulação lipossomal, que utilizou concentrações de mitotano cinco vezes inferiores do que nas formulações convencionais.

A Figura 30 apresenta a porcentagem da massa total de mitotano presente nos segmentos intestinais, obtida após extração utilizando hexano. A Figura 30 indica que, para as formulações mitotano puro e lipossomal, concentrações de mitotano em torno de 26,9 % foram recuperadas dos segmentos intestinais. A análise paralela das Figuras 29 e 30 evidenciam alteração no coeficiente de partição, provocada pela utilização dos lipossomas como sistemas de liberação. Concentrações de 9,3 % a 26,9 % de mitotano (puro, formulação convencional) foram quantificadas nos segmentos intestinais, e 3,2 % a 5,8 % foram observadas no meio interno, indicando permeação. Nas mesmas condições experimentais, ao utilizar a forma lipossomal, na mucosa intestinal foram encontradas 10,7 % a 25,9 % do fármaco e, no meio interno, evidenciando permeação, 17,6 % a 30,7 %. Neste contexto, é possível inferir que, quando na formulação convencional, o fármaco tem maior afinidade pela mucosa intestinal do que pelos meios aquosos, ficando retido, ao passo que o lipossoma adere-se à membrana intestinal e permite a internalização do mitotano em maiores proporções, aumentando a taxa de permeação. Para as formulações mitotano e lipossoma, a concentração da substância ativa no meio interno é diferente da concentração no segmento intestinal ($p < 0,05$).

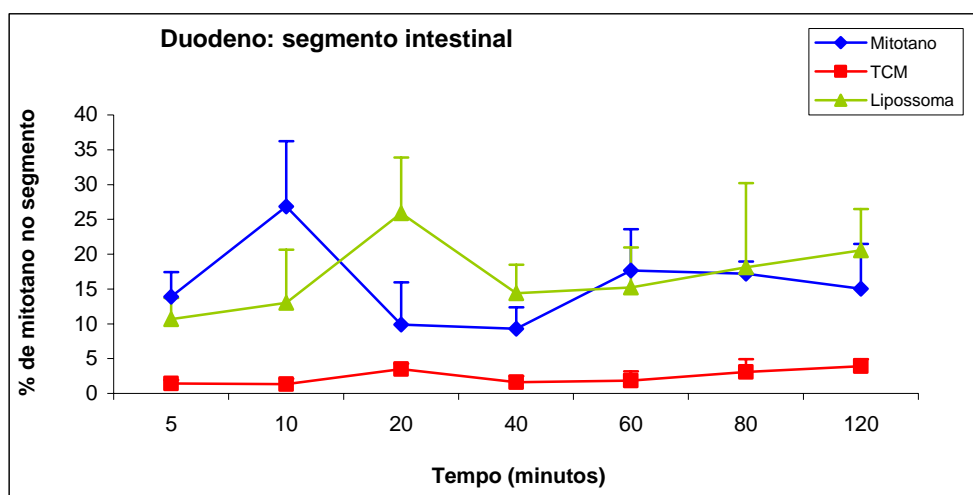


FIGURA 30 – SEGMENTO DUODENAL: CONCENTRAÇÃO DE MITOTANO

A Figura 31 representa a concentração de mitotano no meio externo, ou seja, que não atravessou a membrana intestinal, ilustrando claramente a baixa solubilidade do mitotano em meios aquosos. Apesar de a formulação lipossomal conter uma concentração de mitotano cerca de cinco vezes menor do que as formulações padrão testadas, a quantificação por CLAE identificou maior concentração de mitotano nos testes realizados com o lipossoma porque, quando nesta forma, há uma dispersão melhor e mais homogênea do mitotano no meio aquoso. Para as formulações convencionais, a baixa solubilidade em meio aquoso torna-o não homogêneo, o que explica as diferentes concentrações obtidas ao longo dos tempos do experimento.

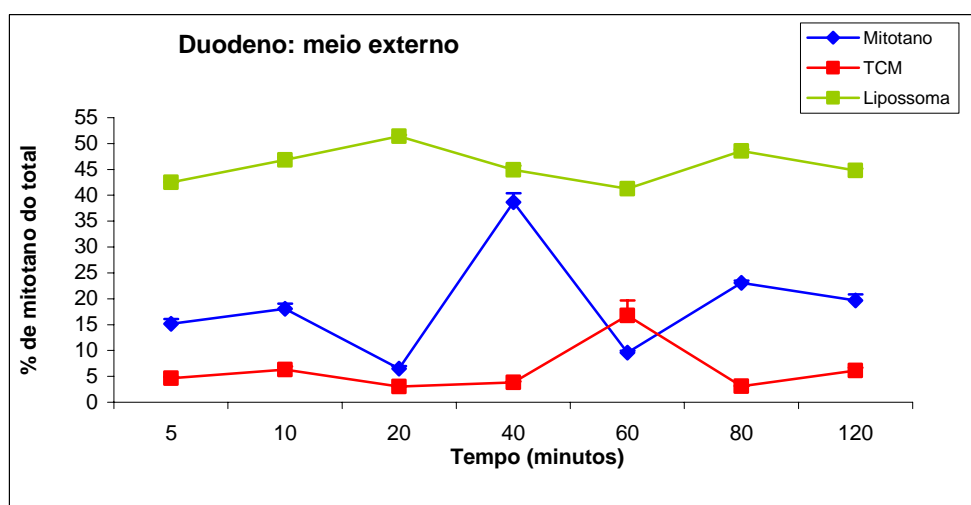


FIGURA 31 – MEIO EXTERNO: CONCENTRAÇÃO DE MITOTANO

Em relação às outras técnicas *in vitro*, a técnica do intestino invertido apresenta algumas vantagens, como simplicidade, rapidez, boa reprodutibilidade e baixo custo. As suas principais desvantagens são a heterogeneidade celular e o fato de que as membranas luminal e basolateral são estudadas em conjunto. As medidas podem ser afetadas pelo fluxo contrário da substância em estudo ou em função dos caminhos paracelulares. Em se tratando de técnica *in vitro*, deve-se também considerar que o modelo animal não reflete os resultados de permeação real obtidos com humanos, e parâmetros fisiológicos tais como tempo de trânsito ou presença de alimentos, as influências da irrigação e do sistema nervoso não são consideradas (BARTHE et al., 1999).

Na última década, a técnica do intestino invertido também vem sendo empregada na avaliação da permeação de fármacos incorporados em sistemas de liberação modificada. CARRENO-GÓMEZ et al. (1999) verificaram que lecitinas ligadas a nanopartículas promoveram aumento na sua permeação, devido à bioadesividade das lecitinas.

5.3.2 Permeabilidade intestinal para os enantiômeros do mitotano

Para provar a especificidade na absorção do colesterol, WESTOVER e colaboradores (2006) marcaram o colesterol e o seu enantiômero sintético (ent-colesterol) com deutério, os dois foram administrados a *hamsters* por intubação intragástrica (gavagem), medidos pelo método de espectrometria de massa na mucosa intestinal e em ensaios de recuperação nas fezes. Os resultados sugerem que a absorção do colesterol é estruturalmente específica e parece ser mediada por proteínas celulares que possuem especificidade enantiomérica (WESTOVER, LIN, RIEHL et al., 2006).

Para investigar se há seletividade na permeação intestinal dos enantiômeros do mitotano, amostras do meio interno, de cada formulação analisada, todas contendo mitotano como mistura racêmica, obtidas após 120 minutos de incubação no ensaio de permeação intestinal, foram avaliadas através de CLAE quiral com coluna de γ -ciclodextrina. Nas amostras analisadas, os enantiômeros (R)-(+)-mitotano e (S)-(-)-mitotano foram identificados em iguais proporções, sugerindo que não há especificidade quiral na permeação do mitotano na membrana intestinal.

5.4 Concentração plasmática do mitotano após administração oral crônica em ratos

De acordo com a literatura quando administrados pela mesma via de administração, espera-se que a farmacocinética de um ativo em formulação lipossomal seja diferente da cinética do mesmo ativo em formulação não lipossomal. Por esse motivo, o estudo farmacocinético deve incluir uma avaliação comparativa entre forma lipossomal e não lipossomal, para estabelecimento de dose (US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2002).

As três formulações contendo mitotano foram administradas cronicamente a três grupos de nove ratos machos Wistar, por via oral através de intubação, durante 21 dias, para avaliação da concentração plasmática em amostras de sangue colhidas nos dias 0, 7, 14 e 21, para avaliação da sua biodisponibilidade comparativa da substância ativa quando na forma lipossomal e nas formulações padrão.

Para determinação da concentração do mitotano em plasma de ratos, um método para análise por CG-CE, com preparo de amostra utilizando extração em fase sólida, foi desenvolvido e validado, precedido de precipitação das proteínas plasmáticas com acetona.

5.4.1 Extração em fase sólida (SPE)

Métodos de limpeza são necessários quando os métodos de extração não são suficientemente seletivos, com o objetivo de isolar os analitos de interesse dos coextrativos da amostra, que podem vir a interferir na técnica usada para a quantificação. Em amostras biológicas, lipídios representam um interferente potencial para a determinação de compostos não polares. Em extração em fase sólida, o extrato do plasma é adicionado à coluna, que deve reter os contaminantes, especialmente lipídios, e permitir a eluição do analito de interesse mediante utilização de solventes com polaridades adequadas (YEA KUB e COLE, 1998).

Todos os testes para limpeza da amostra foram realizados com o Florisil, que é um silicato de magnésio ativado, cujas características são apresentadas na Tabela 13. Seguindo a orientação do Método 3620C (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2000), o Florisil foi ativado a 130 ° C durante 12 horas antes do uso.

TABELA 13 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA TÍPICA DO FLORISIL

| COMPOSIÇÃO QUÍMICA TÍPICA DO FLORISIL | |
|---|---------------|
| SiO ₂ (dióxido de silício) | 84,0 % |
| MgO (óxido de magnésio) | 15,5 % |
| Sulfato de sódio (Na ₂ SO ₄) | 0,5 % |
| Tamanho dos poros | 60 – 100 mesh |

FONTE: <http://www.u-s-silica.com/florisil.htm>. Acesso em 27/06/2008.

As condições testadas para otimização da limpeza do extrato do plasma utilizando extração em fase sólida estão listadas nas Tabelas 14 e 15, bem como comentários referentes aos resultados obtidos.

Resultados e Discussão

TABELA 14 – MÉTODOS TESTADOS NA OTIMIZAÇÃO DA LIMPEZA DO EXTRATO DO PLASMA ATRAVÉS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA, PARA ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA

| MÉTODOS TESTADOS | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 |
|---------------------------------|---|--------------------------|---|--|--------------------------|---|
| Na ₂ SO ₄ | 0,2 g | 0,2 g | 0,2 g | 0,2 g | 0,2 g | 0,2 g |
| Florisil | 1 g | 1 g | 0,5 g | 1 g | 1 g | 1 g |
| Condicionamento 1 | Hexano, 1 x 4mL | Hexano, 1 x 4mL | Hexano, 1 x 4mL | Hexano, 1 x 4mL | Hexano, 1 x 4mL | Hexano, 1 x 4mL |
| Condicionamento 2 | - | - | - | - | - | - |
| Amostra | Solução padrão 1 pg | Extrato de plasma branco | Extrato de plasma fortificado com mitotano 0,4 pg | Solução padrão 1 pg | Extrato de plasma branco | Extrato de plasma fortificado com mitotano 0,4 pg |
| Eluição | Acetona/hexano 1:9 (v/v) 3 x 5 mL | | | Acetona/hexano 1:9 (v/v) 1 x 10 mL | | |
| Coleta de frações na eluição? | 3 | 3 | 3 | Não | | |
| Comentário análise CG-CE | Presença de mitotano nas três frações, em concentração muito pequena na terceira fração. Eluir com 10 mL de acetona/hexano 1:9 (v/v). | | | <p>A solução padrão de mitotano (1 ng/mL) apresentou pico com área de 31415 mAU.</p> <p>A amostra branco apresentou um interferente, no mesmo tempo de retenção do mitotano, com área de 2342 mAU. Pela área do pico, este interferente não compromete as análises.</p> <p>O extrato do plasma contendo o padrão apresentou área de 6581 mAU, correspondendo a 100 % de recuperação do mitotano, nas condições empregadas.</p> <p>Próximas tentativas: melhorar a limpeza da amostra, retirando os interferentes apontados na Figura 32.</p> | | |

CONTINUAÇÃO

| MÉTODOS TESTADOS | 3 | 3 | 4 | 4 |
|---------------------------------|---|---|---|---|
| Na ₂ SO ₄ | 0,2 g | 0,2 g | 0,2 g | 0,2 g |
| Florisil | 1 g | 0,5 g | 1 g | 1 g |
| Condicionamento 1 | Acetona/hexano 2:8 (v/v) 1 x 4 mL | | Acetona/hexano 2:8 (v/v) 1 x 4 mL | |
| Condicionamento 2 | Diclorometano/hexano 3:7 (v/v) 1 x 4 mL | | Diclorometano/hexano 3:7 (v/v) 1 x 4 mL | |
| Amostra | Extrato de plasma branco | Extrato de plasma fortificado com mitotano 1 pg | Extrato de plasma branco | Extrato de plasma fortificado com mitotano 1 pg |
| Eluição | Acetona/hexano 2:8 (v/v) 2 x 4 mL | | Diclorometano/hexano 3:7 (v/v) 2 x 4 mL | |
| Coleta de frações? | Duas frações | | Duas frações | |
| Comentário análise CG-CE | Comparando os dois métodos testados, o emprego de diclorometano/hexano no condicionamento do teste 4 foi mais eficiente na eliminação de interferentes, mas teve uma taxa de recuperação do ativo menor. Ao utilizar acetona/hexano para eluição, 100 % do mitotano foi eluído na primeira fração. | | | |

Considerando os resultados obtidos com os testes 3 e 4, Tabela 14, os próximos testes (Tabela 15) tiveram o objetivo de reduzir a quantidade de Florisil e confirmar as condições de eluição. A partir das tentativas descritas na Tabela 15, foram padronizadas as condições do teste 6 para limpeza do extrato do plasma através de extração em fase sólida utilizando Florisil.

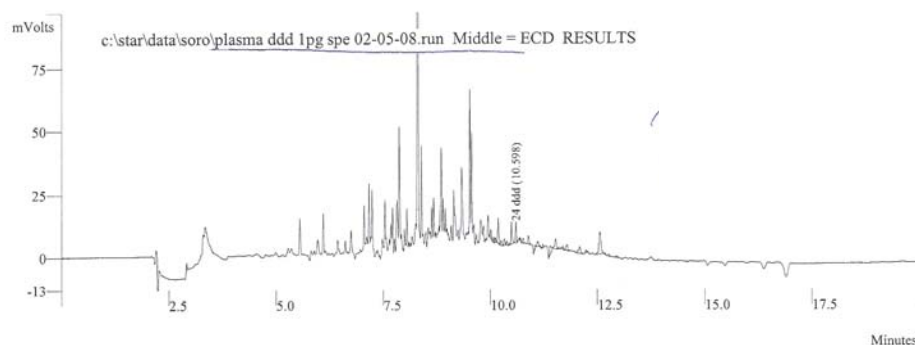


FIGURA 32 – CROMATOGRAMA DE CG-CE OBTIDO DURANTE O TESTE DO MÉTODO 2 DA TABELA 14

TABELA 15 – TESTES PARA REDUÇÃO DA MASSA DE FLORISIL NECESSÁRIA PARA LIMPEZA DO EXTRATO DO PLASMA ATRAVÉS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

| MÉTODOS TESTADOS | 5 | 5 | 6 | 6 |
|---------------------------------|--|---|---|---|
| Na ₂ SO ₄ | 0,2 g | 0,2 g | 0,2 g | 0,2 g |
| Florisil | 0,5 g | 0,5 g | 0,5 g | 0,5 g |
| Condicionamento 1 | Acetona/hexano 2:8 (v/v) 1 x 4 mL | | Acetona/hexano 2:8 (v/v) 1 x 4 mL | |
| Condicionamento 2 | Diclorometano/hexano 3:7 (v/v) 1 x 4 mL | | Diclorometano/hexano 3:7 (v/v) 1 x 4 mL | |
| Amostra | Extrato de plasma branco | Extrato de plasma fortificado com mitotano 1 pg | Extrato de plasma branco | Extrato de plasma fortificado com mitotano 1 pg |
| Eluição | Diclorometano/hexano 3:7 (v/v) 1 x 4 mL | Diclorometano/hexano 3:7 (v/v) 3 x 4 mL | Acetona/hexano 2:8 (v/v) 1 x 4 mL | Acetona/hexano 2:8 (v/v) 3 x 4 mL |
| Coleta frações? | Não | 3 frações | Não | 3 frações |
| Comentário análise CG-CE | A utilização de diclorometano/hexano na eluição é mais eficiente na eliminação de interferente, mas a recuperação do analito é inferior à obtida utilizando-se as condições de eluição do teste 6. | | Limpeza adequada da amostra, com recuperação do mitotano de 100 %. Esta condição foi utilizada para todas os extratos de plasmas de ratos. O cromatograma ilustrando essas condições é apresentado na Figura 26. | |

Nos testes 5 e 6 da Tabela 13, o diclorometano é menos polar do que a acetona e está sendo usado em menor proporção, não tendo força suficiente para eluir todo o mitotano da fase sólida. Apesar da maior eficiência na limpeza da amostra com as condições do teste 5, os interferentes presentes no cromatograma obtido com o teste 6 (Figura 33) permitem uma adequada detecção do mitotano, que possui tempo de retenção de 10,598 minutos. Os parâmetros do teste 6 foram padronizados e utilizados no preparo das demais amostras.

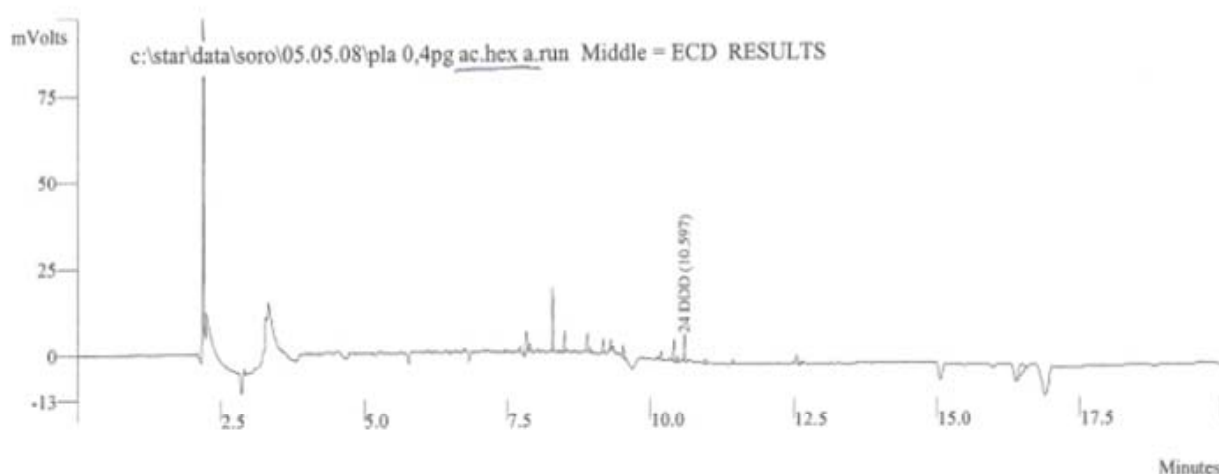


FIGURA 33 – CROMATOGRAMA DE CG-CE OBTIDO UTILIZANDO AS CONDIÇÕES PADRONIZADAS PARA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

5.4.2 Curva analítica, linearidade e efeito da matriz

O efeito da matriz é causado por substâncias co-extrativas que podem causar a perda ou o acréscimo do sinal cromatográfico, influenciando na quantificação dos compostos de interesse (KLOEPFER et al., 2005).

Para avaliação do efeito da matriz, duas curvas analíticas foram construídas, sendo uma em hexano e outra a partir do extrato do plasma (após tratamento com acetona e extração em fase sólida). As curvas analíticas em solvente e no extrato estão apresentadas nas Figuras 34 e 35, respectivamente, contendo pontos variando de 0,5 ng.mL⁻¹ até 10 ng.mL⁻¹.

A faixa de trabalho compreende um determinado intervalo de concentração em que o analito pode ser quantificado com exatidão, precisão e linearidade adequadas. Este intervalo foi definido nas concentrações de 0,5; 2,5; 5; 7,5 e 10 ng/mL. A linearidade da faixa de trabalho do analito foi determinada por análise de variância, pelo cálculo da falta de ajuste (*lack of fit*), conforme Figuras 34, 35 e 36.

A partir dos resultados obtidos pelas respectivas áreas do cromatograma, foi executado o tratamento estatístico dos dados utilizando uma planilha Excel®. Foram construídas, através do método dos mínimos quadrados, as curvas analíticas. Utilizando o cálculo

dos resíduos padronizados, foi obtido um gráfico para estimar a linearidade das curvas. Utilizando o cálculo da análise de variância para a falta de ajuste, foi confirmada a linearidade das curvas de calibrações.

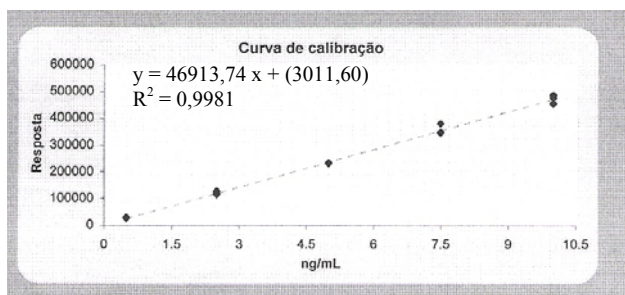


FIGURA 34 – CURVA ANALÍTICA DO MITOTANO EM HEXANO

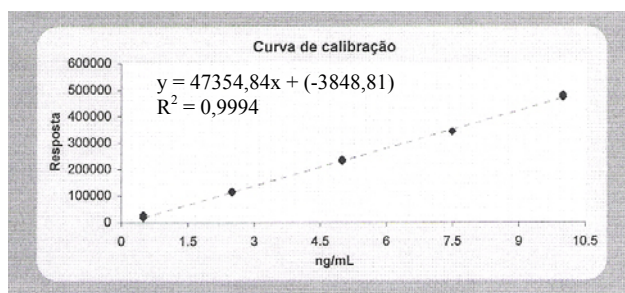


FIGURA 35 – CURVA ANALÍTICA DO MITOTANO NO EXTRATO DO PLASMA

O estudo do efeito da matriz é apresentado na Figura 36. Mediante avaliação dos resultados do teste t de Student, nota-se que os coeficientes angulares das curvas analíticas no extrato e no solvente não são significativamente diferentes, confirmando que não há efeito da matriz. Desta forma, foi utilizada a curva analítica construída com o solvente.

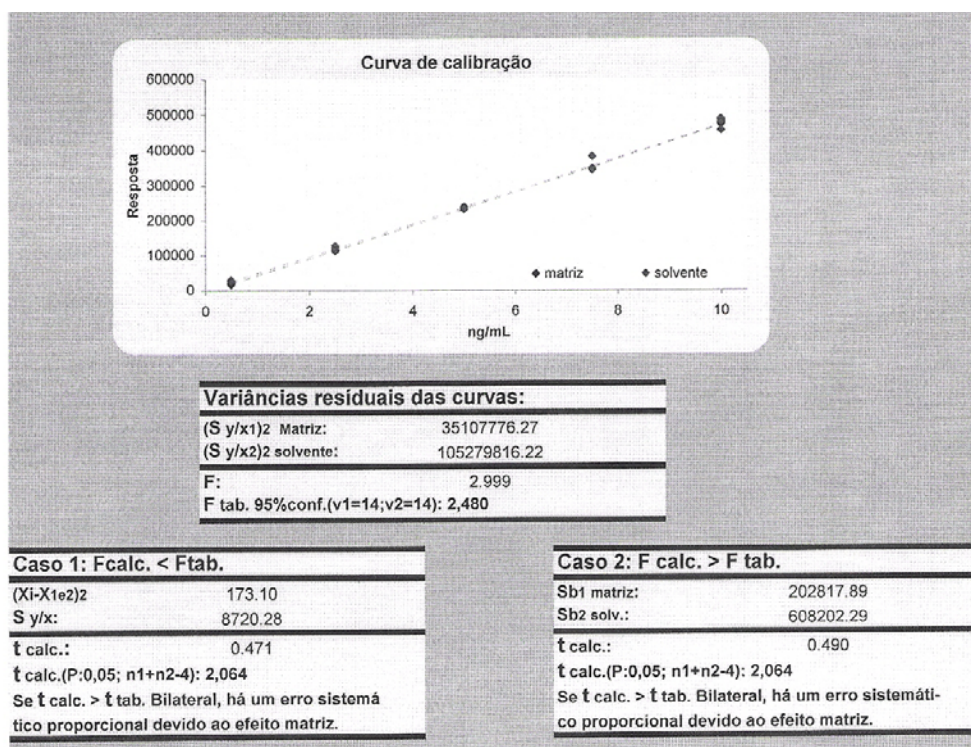


FIGURA 36 – COMPARAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS DO MITOTANO, EM HEXANO E EM EXTRATO DE PLASMA, PARA INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA MATRIZ

5.4.3 Especificidade

O objetivo da especificidade é verificar a capacidade que o método analítico possui em discriminar a substância a analisar de outras substâncias presentes na matriz. Para tal avaliação, uma amostra de plasma branco foi tratada com acetona e, posteriormente, submetida à extração em fase sólida, nas condições padronizadas. Pode-se observar a presença de um interferente, com área de 3448 mAU, no mesmo tempo de retenção do mitotano (10,598 minutos) que, em função da pequena área, não prejudicará as quantificações do mitotano.

5.4.4 Precisão, exatidão e recuperação

Como não foi possível disponibilizar um material de referência certificado, a exatidão foi calculada pela recuperação do mitotano adicionado às amostras de plasma branco.

A exatidão do método foi determinada através do estudo das recuperações das mitotano, fortificando dois níveis de cinco alíquotas de plasma branco de ratos. Os níveis de fortificações estipulados foram de 1 ng.mL^{-1} e 10 ng.mL^{-1} . Após a realização dos testes, foram calculadas a recuperação global média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo (Tabela 16), que demonstra uma recuperação média do mitotano de 97,1 %. Os intervalos indicativos para os desvios da recuperação ficaram dentro dos estipulados pela ANVISA, 2003.

A precisão do método analítico foi determinada pelos estudos da repetitividade, que avaliam a diferença das repetições das recuperações, utilizando o mesmo procedimento de medição, o mesmo analista, o mesmo local e repetições em um curto espaço de tempo. A repetitividade do método foi determinada no estudo da recuperação e é apresentada na Tabela 16.

TABELA 16 – DETERMINAÇÃO DA EXATIDÃO E PRECISÃO DO MÉTODO DE CG-CE PARA QUANTIFICAÇÃO DE MITOTANO EM PLASMA DE RATOS

| Parâmetro | Aplicação | NÍVEIS DE FORTIFICAÇÃO | | Médias |
|------------------------|-----------|------------------------|-------------------------|--------|
| | | 1 ng.mL^{-1} | 10 ng.mL^{-1} | |
| Recuperação | Exatidão | 98,2% | 96% | 97,1% |
| Desvio padrão relativo | Precisão | 3,8% | 3,3% | 3,6% |

5.4.5 Avaliação da biodisponibilidade relativa

Cerca de 1 mL de sangue com anticoagulante heparina foi colhido, da cauda de cada animal, nos dias 0, 7, 14, 21 do experimento. O plasma foi separado através de centrifugação e mantido congelado até a realização das análises.

As amostras de plasma foram espontaneamente descongeladas, à temperatura ambiente, e submetidas ao preparo com acetona. Após agitação e centrifugação, o sobrenadante foi concentrado até próximo da secura, o resíduo foi ressuspensionado com 1 mL de hexano e utilizado para extração em fase sólida, conforme condições já padronizadas. O eluato da extração em fase sólida foi evaporado com o auxílio de corrente de nitrogênio, o resíduo foi ressuspensionado com 1 mL de hexano e analisado em cromatografia em fase gasosa com detecção por captura de elétrons (CG-CE).

A Figura 37 apresenta as concentrações plasmáticas do mitotano, ao longo dos 21 dias de tratamento, para as formulações não lipossomais e lipossomal. Deve-se ressaltar que a concentração de mitotano disponível nos lipossomas (2,117 mg) é cerca de cinco vezes menor do que a dose administrada aos animais do grupo mitotano (puro) e do grupo TCM, que receberam 10 mg do ativo por dia. A concentração de mitotano na forma lipossomal é menor do que nas formas não lipossomais ($p < 0,05$).

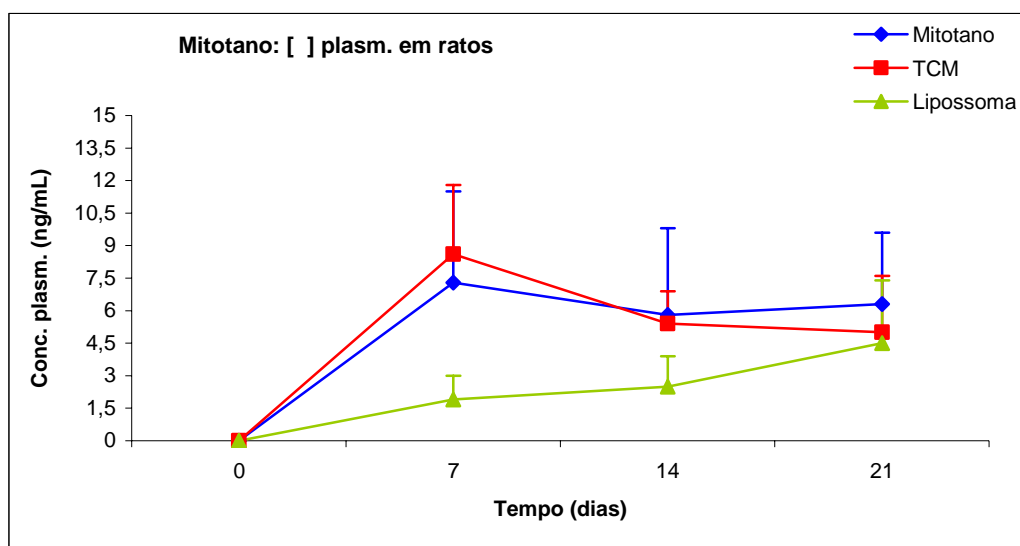


FIGURA 37 – CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE MITOTANO, NAS TRÊS DIFERENTES FORMULAÇÕES, DURANTE TRATAMENTO CRÔNICO

Entretanto, quando as concentrações de mitotano no plasma são expressas em porcentagem da dose total administrada durante o período, obtém-se o gráfico apresentado na Figura 38.

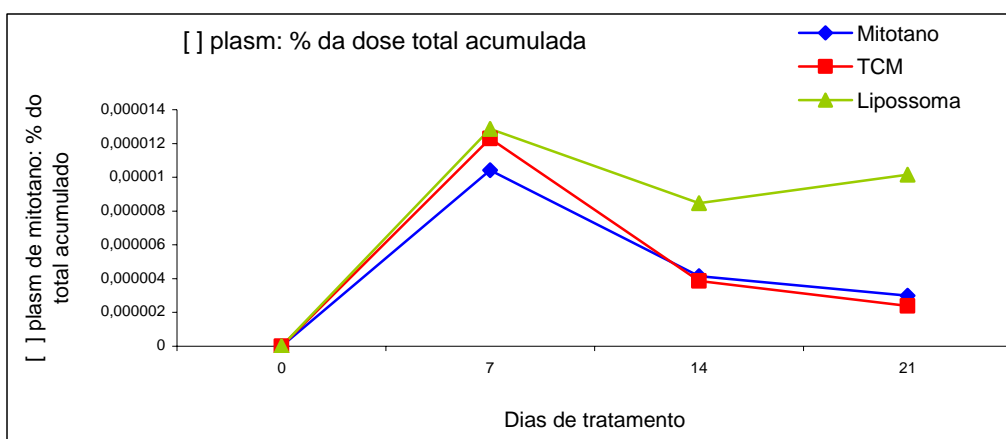


FIGURA 38 – CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE MITOTANO EM % DO TOTAL ADMINISTRADO, NAS TRÊS DIFERENTES FORMULAÇÕES, DURANTE TRATAMENTO CRÔNICO

A Figura 38 indica que a concentração plasmática de mitotano (expressa como porcentagem do total administrado) para a formulação lipossomal, a partir de 14 dias de tratamento crônico, é maior do que a concentração para as formulações padrão ($p < 0,05$). Isso confirma os resultados dos ensaios com segmentos intestinais invertidos, quando a formulação lipossomal promoveu maiores taxas de permeação do ativo, quando comparado às formulações padrão.

Além da avaliação das concentrações plasmáticas, foi possível notar significativa diferença entre o comportamento dos animais tratados com lipossoma ou com as outras formulações. Os animais recebendo lipossoma se apresentaram menos irritadiços, mais dóceis, menos resistentes no momento da administração da formulação. Esse comportamento pode ser explicado pela menor incidência de reações adversas, associada à menor dose do medicamento. Um dos objetivos da encapsulação do mitotano em lipossomas, em busca de maior biodisponibilidade, é o emprego de doses

menores, atingindo concentrações plasmáticas consideradas terapêuticas, com menor incidência de reações adversas.

A literatura apresenta dois relatos de administração de mitotano a animais. DE FRANCIA e colaboradores (2006) acrescentaram o mitotano à dieta padrão, na proporção de 1 %, e alimentaram os ratos, que foram sacrificados após 3, 4 e 80 dias para obtenção de órgãos e sangue. O mitotano e seus metabólitos (DDA e DDE) foram quantificados através de CLAE. Entretanto, não é possível comparar tal experimento com o desenvolvido nesse trabalho, pois a dose diária de mitotano claramente apresentada, já que não se sabe quanto da dieta foi ingerida por animal, por dia, e o método analítico empregado é diferente (CLAE).

HERMANSSON et al. (2006) administraram mitotano em doses orais únicas de 30 mg/Kg, a 5 porquinhos-da-índia. Amostras de sangue foram colhidas 0,5 horas até 180 dias após a administração da dose única, para determinação da concentração de mitotano através de cromatografia em fase gasosa com detecção por captura de elétrons (CG-CE). A concentração de mitotano também foi determinada no tecido adiposo, nas adrenais e no fígado após 180 dias da administração da dose única, através de CG-CE. O preparo das amostras, especialmente o plasma, para análise por CG-CE é mais complicado e possui mais etapas do que o método proposto nesta pesquisa, desenvolvido com base no Método 3620C. As concentrações plasmáticas obtidas por HERMANSSON et al. (2006) não podem ser comparadas com os dados desta pesquisa devido à utilização de diferentes animais, com diferentes metabolismos.

6 Considerações Finais e Conclusões

6.1 Considerações finais e conclusões

Na avaliação da composição enantiomérica nas amostras submetidas ao ensaio de permeação intestinal em ratos, que utilizou o mitotano na forma de mistura racêmica, os enantiômeros (+) e (-) da substância ativa foram identificados em iguais proporções. Desta forma, a possível permeação ou absorção estereosseletiva para os enantiômeros do mitotano no intestino não foi confirmada, nos ensaios com ratos.

Os ensaios qualitativos realizados com amostras de plasma de pacientes e CLAE com coluna quiral de γ -ciclodextrina indicam que há excesso enantiomérico para o (R)-(+), sugerindo que o (S)-(-) é metabolizado em maior proporção. Com base nesta determinação, postula-se a existência de caminhos metabólicos diferenciais para os enantiômeros do mitotano, em condições idênticas. Merecem investigações as possíveis diferenças terapêuticas e tóxicas entre os enantiômeros do mitotano. Até o momento, este é o primeiro método descrito para determinação dos enantiômeros do mitotano em amostras de plasma de humanos e não há relatos de investigações, na literatura, sobre o metabolismo diferencial dos enantiômeros em humanos ou animais.

Não há, na literatura, referência às modificações na formulação do mitotano utilizando encapsulação em fosfolipídios. Utilizando secagem por atomização (*spray-drying*) e posterior hidratação, foi possível obter e caracterizar oito formulações de três diferentes grupos. Para avaliações comparando com formulações consideradas padrão (mitotano puro e mitotano misturado à dieta enteral TCM) mediante ensaio de permeação intestinal (*in vitro*) e biodisponibilidade relativa por administração crônica por intubação intragástrica (*in vivo*), foi escolhida a formulação com maior proporção molar fosfolipídio/mitotano (3,34:1), 100 % de eficiência de encapsulação da substância ativa e vesículas com diâmetro em torno de 1 μ m.

Para realização dos ensaios *in vitro* e *in vivo*, o mitotano na forma lipossomal foi utilizado em doses cinco vezes menores do que nas formulações convencionais. As taxas de permeação intestinal foram maiores para a formulação lipossomal ($p < 0,05$)

quando comparado com as formulações convencionais. A maior taxa de permeação, para a forma lipossomal, pode ser explicada pela alteração do coeficiente de partição octanol-água promovida pelos fosfolipídios.

O método analítico desenvolvido neste trabalho, para a identificação e quantificação de mitotano em plasma de ratos, utilizando CG-CE, foi validado e considerado adequado para o uso pretendido. O método de extração em fase sólida utilizado não é apresentado na literatura para tratamento de amostras de plasma.

No ensaio crônico com administração oral, aos ratos, das três formulações, as concentrações plasmáticas foram menores para a formulação lipossomal ($p < 0,05$) quando comparado com as formulações convencionais. Entretanto, quando as concentrações de mitotano no plasma foram expressas como porcentagem do total de mitotano administrado foi observada maior concentração de mitotano no plasma para a formulação lipossomal ($p < 0,05$). É importante ressaltar que, da mesma forma que no ensaio de permeação intestinal, no ensaio crônico, a formulação lipossomal utilizou doses de mitotano cinco vezes menores do que as utilizadas nas formulações lipossomais. Isso corrobora os resultados obtidos com os ensaios dos intestinos invertidos.

De modo geral, conclui-se que o processo de encapsulação do mitotano em lipossomas, a partir da incorporação prévia do mitotano na matriz de fosfolipídios, é factível e promissor, com eficiência de encapsulação da substância ativa de 100 %. A formulação lipossomal do mitotano tem potencial para fornecer maiores taxas de absorção e maiores concentrações plasmáticas, com o uso de doses menores e, provavelmente, menor incidência e/ou menor severidade de reações adversas.

6.2 Recomendações para futuros trabalhos

- Elucidação e confirmação experimental da rota metabólica seletiva para os enantiômeros do mitotano.
- Investigação da ação farmacológica, farmacocinética e farmacodinâmica dos enantiômeros separadamente.

-
- Investigação da estabilidade das formulações lipossomais em meio ácido simulado.
 - Desenvolvimento de novos métodos de encapsulação do mitotano, como as nanopartículas lipídicas sólidas (*solid lipid nanoparticles*).

7 Referências Bibliográficas

ACRA S.A.; GHISHAN F.K. Methods of investigating intestinal transport. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.15, n.2, Supplement, p93S-98S, 1991.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Brasília: **Diário Oficial da União**. 02/02/2003.

AGRAWAL, P. K.; JAIN, D. C.; GUPTA, R. K.; THAKUR, R. S. Carbon-13 NMR spectroscopy of steroidal sapogenins and steroidal saponins. **Phytochemistry**. 1985 v. 24 (11) p. 2479-2496.

ABIVEN G, COSTE J, GROUSSIN L, ANRACT P, TISSIER F, LEGMANN P, DOUSSET B, BERTAGNA X, BERTHERAT J. Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.91, n.7, p.2650-5, 2006.

ABRAHAM, F.; BAKKE, S.; RUTT, A. et al. A phase II trial of combination chemotherapy and surgical resection for the treatment of metastatic adrenocortical carcinoma. **Cancer**, v.94, n.9, p. 2333-2343, 2002.

AGÊNCIA Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Brasília: Diário Oficial da União. 02/02/2003.

AGENCY for Toxic Substances and Disease Registry, Department of Health and Human Service, EUA. Disponível em <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp35-c4.pdf>, acesso em 20 de maio de 2005.

ALEKSA K., ITO S., KOREN G. Enantioselective metabolism of ifosfamide by the kidney. **Chirality**, v.18, n.6, p.398-405, 2006.

ALI, I.; ABOUT-ENEIN, H.I. Determination of chiral ratio of o,p-DDT and o,p'-DDD pesticides on polysaccharides chiral stationary phases by HPLC under reversed-phase mode. **Environment Toxicology**, v.7, n.4, p.329-333, 2002.

ALI I.; ABOUL-ENEIN H.Y. Impact of immobilized polysaccharide chiral stationary phases on enantiomeric separations. **Journal of Separation Science**, v.29, n.6, p.762 – 769, 2006.

ALVES G.P.; SANTANA M.H.A Phospholipid Dry Powders Produced by Spray Drying Processing: structural, thermodynamic and physical properties. **Powder Technology**, v.145, n.2, p.139-148, 2004.

AMIDON G., LENNERNÄS, H., SHAH, V.P., CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vivo drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharm. Res.**, v.12, p.413-420, 1995.

ANDERSEN, A.; WARREN, D.J.; NOME, O. et al. A high-pressure liquid chromatography method for measuring mitotane [1,1-(o-p'-dichlorodiphenyl)-2,2-dichloroethane] and its metabolite 1,1-(o-p1'-Dichlorodiphenyl)-2,2-dichloroethene in plasma. **Ther Drug Monit.**, v.17, n.5, p. 526-531, 1995.

ARMSTRONG D.W.; REID III G.L.; HILTON M.L.; CHANG C.D. **Environmental Pollution**, v.79, n.1, p.51-58, 1993.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Brasil, 2001.

BARTHE L.; BESSOUET M.; WOODLEY J.F.; HOUIM G. The improved everted gut sac: a simple method to study intestinal P-glycoprotein. **Int J Pharm.**, v.173, p.255-258, 1998.

BARTHE L.; WOODLEY J.F.; HOUIM G. Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v.13, p.154-168, 1999.

BARTLETT G. R. Phosphorus Assay in Column Chromatography. **The Journal of Biological Chemistry**, n.234, p.466-468, 1959.

BAUDIN, E.; PELLEGRITI, G.; BONNAY, M. et al. Impact of Monitoring Plasma 1,1-Dichlorodiphenildichloroethane (o,p'DDD) Levels on the Treatment of Patients with Adrenocortical Carcinoma. **Cancer**, v.92, n.6, p.1385-1392, 2001.

BERRUTI A.; TERZOLO M.; SPERONE P.; PIA A.; DELLA CASA S.; GROSS D. J.; CARNAGHI C.; CASALI P.; PORPIGLIA F.; MANTERO F.; REIMONDO G.; ANGELI A.; DOGLIOTTI L. Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma: a large prospective phase II trial. **Endocrine-Related Cancer**, v.12, p. 657–666, 2005.

BERRUTI, A.; TERZOLO, M.; PIA, A. et al. Mitotane associated with etoposide, doxorubicin, and cisplatin in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma. Italian Group for the Study of Adrenal Cancer. **Cancer**, v.83, n.10, 2194-2200, 1998.

BOLLEN, E.; LANSER, J.B.K. Reversible mental deterioration and neurological disturbances with o,p'-DDD therapy. **Clin Neurol Neurosurg.**, v.94, p.S49-S51, 1992.

BUSER H.R.; MÜLLER M.D. Isomer-selective and enantiomeraselective determination of DDT and related compounds using chiral high-resolution gas chromatography/liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 15, p. 2691-98, 1995.

CAI, W.; COUNSELL, R.E.; DJANEGARA, T. et al. Metabolic activation and binding of mitotane in adrenal cortex homogenates. **J Pharm Sciences**, v.84, n.2, p.134-1389, 1995.

CANCER Care Ontário, Cancer Drug Information: Mitotane, 2007. Disponível em <http://www.cancercare.on.ca/pdfdrugs/Mitotane.pdf>. Acesso em 20/07/2008.

CARRENO-GÓMEZ B., WOODLEY J.F.; FLORENCE A.T. Studies on the uptake of tomato lectin nanoparticles in everted gut sacs. **Internation Journal of Pharmaceutics**, v.183, p.7-11, 1999.

CENTER Disease Control and Prevention. DDT, DDD, DDE: Chemical and Physical Information. Disponível em <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp35-c4.pdf>; acesso em 06/07/2008.

CIOLA R. Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho HPLC. São Paulo: **Ed. Edgard Blücher**, 1998.

COLLABORATIVE Group for Adrenocortical Carcinoma Therapy. First International Randomized trial in locally advanced and Metastatic Adrenocortical Carcinoma Treatment (FIRM-ACT): Etoposide, Doxorubicin, Cisplatin and Mitotane vs. Streptozotocin and Mitotane". 2004. Disponível em http://www.firm-act.org/documents/FIRM_ACT_protocol_final.pdf. Acesso em 15 de maio de 2007.

COLLINS C.; BRAGA G.L.; BONATO P.S. Introdução a Métodos Cromatográficos. Campinas, SP: **Editora da Unicamp**, 7. ed., 1997.

COPLAND M. J.; RADES T.; DAVIES N. M. Hydration of lipid films with an aqueous solution of Quil A: a simple method for the preparation of immune-stimulating complexes. **International Journal of Pharmaceutics**, n.196, p.135-139, 2000.

CROMMELIN, D.J.A.; SCHEREIER, H. Liposomes. In: Kreuter, **J. Colloidal Drug Delivery Systems**. Nova Iorque: Marcek Dekker, Inc., v.66, p.73-190, 1994.

DAGHASTANLI K. R. P.; FERREIRA R. B.; THEDEI JR G.; MAGGIO B.; CIANCAGLINI P. Lipid composition-dependent incorporation of multiple membrane proteins into liposomes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, n.36, p.127-137, 2004.

DE FRANCIA S.; PIRRO, E.; ZAPPIA, F. et al. A new simple HPLC method for measuring mitotan and its two principal metabolites. Tests in animals and mitotane-treated patients. **Journal of Chromatography B**, n.837, p.69-75, 2006.

DEL RIO A. Chiral Recognition Mechanisms in High Performance Liquid Chromatography: Theoretical and Chemoinformatics Studies. UNIVERSITE DE DROIT, D'ECONOMIE ET DES SCIENCES D'AIX-MARSEILLE III, France. Thesis, 2005. Disponível em www2.chemie.uni-erlangen.de/people/Alberto_Del_Rio/del-rio_thesis.pdf. Acesso em 30 de maio de 2007.

DICKSTEIN, G.; SHECHNER, C.; ARAD, E.; et al. Is there a Role for Low Doses of Mitotane (o,p'-DDD) as Adjuvant Therapy in Adrenocortical Carcinoma? **J Clin Endocrinol Metab**, v.83, n.9, p.3100-3103, 1998.

DÍEZ C.; TRAAG, W.A.; ZOMMERB P.; MARINERO P.; ATIENZA J. Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. **Journal of Chromatography A**, n.1131, p.11–23, 2006.

DIRECTIVA 2002/657/CEE do Conselho, 12 agosto de 2002; **Jornal Oficial das Comunidades Européias**. 2002, L 221, 8.

DODANE V.; KHAN M.A.; MERWIN J.R. Effects of chitosan on epithelial permeability and structure. **Internation Journal of Pharmaceutics**, v.182, p.21-32, 1999.

EDWARDS K. A.; BAEUMNER A. J. Analysis of liposomes. **Talanta**, n.68, p.1432–1441, 2006.

US Enviromental Protection Agency. Method 3620C: Florisil Cleanup. Washington, DC, 2007. Disponível em <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/3620c.pdf> Acesso em 26/06/2008.

ERIKSSON T.; BJORKMAN S.; ROTH B.; FYGE A.; HOGLUND P. Stereospecific Determination, Chiral Inversion In Vitro and Pharmacokinetics in Humans of the Enantiomers of Thalidomide. **Chirality**, v.7, p.44-52, 1995

FERDOUS M. BARLASKAR & GARY D. HAMMER. The molecular genetics of adrenocortical carcinoma. **Rev Endocr Metab Disord**, v.8, p.343–348, 2007.

GONZALEZ R.J.; TAMM E.P.; NG C.; PHAN A.T.; VASSILOPOULOU-SELLIN R.; PERRIER N.D.; EVANS D.B.; LEE L.E. Response to mitotane predicts outcome in patients with recurrent adrenal cortical carcinoma. **Surgery**, n.142, v.6, p.867-75, 2007.

GROB, R.L. **Modern Practice of Gas Chromatography**. 3 ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1995. 888 p.

GUBITZ G.; SCHMID, M.G. Chiral Separation Principles in Chromatographic and Electromigration Techniques. **Molecular Biotechnology**, n.32; v.2, p.159-179, 2006.

HAAK, H. R.; HERMANS, J; VAN DE VELDE, C. J. H. et al. Optimal treatment of adrenocortical carcinoma with mitotane: results in a consecutive series of 96 patientes. **Br J Cancer**, v.69, n.5, p.947-951, 1994.

HART, M. M.; REAGAN, R.L. e ADAMSON, R.H. Effect of Isomers of Ddd on Acth-Induced Steroid Output, Histology and Ultrastructure of Dog Adrenal-Cortex. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.24, p.101-113, 1973.

HERMANSSON V.; CANTILLANA T.; HOVANDER L.; BERGMAN A.; LJUNGVALL K.; MAGNUSSON U.; TÖRNEKE K.; BRANDT I. Pharmacokinetics of the adrenocorticolytic compounds 3-methylsulphonyl-DDE and *o,p*-DDD (mitotane) in Minipigs. **Cancer Chemother Pharmacol**, n.61; p.267–274, 2008.

HE P, DAVIS SS, ILLUM L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. **Int J Pharm**, v.166, p.53-65, 1998.

HUTCHISON, T. A.; SHAHAN, D. R. DRUGDEX System. Electronic version, vol. 120, **MICROMEDEX**, Inc. Greenwood Village, Colorado, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. 65.3120.078: métodos de análise para resíduos de medicamentos veterinários em alimentos: protocolo de validação. Brasil, 2003.

IUPAC Compendium of Chemical Terminology, Electronic version, <http://goldbook.iupac.org/E02070.html>; acesso em 18/07/2008.

JASUS A., OEHME M. Consequences of variable purity of heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)- β -cyclodextrin determined by liquid chromatography-mass spectrometry on the enantioselective separation of polychlorinated compounds. **Journal of Chromatography A**, v.905, n.1-2, p.59-67, 2001.

JIMENEZ TORRES M.; CAMPOY FOLGOSO C.; CAÑABATE RECHE F.; RIVAS VELASCO A.; CERRILLO GARCIA I.; MARISCAL ARCAS M.; OLEA-SERRANO F. Organochlorine pesticides in serum and adipose tissue of pregnant women in Southern Spain giving birth by cesarean section. **Science of the Total Environment**, v.372, p.32-38, 2006.

KASPERLIK-ZALUSKA, A. A. Clinical Results of the Use of Mitotane for Adrenocortical Carcinoma. **Braz J Med Biol Res**, v.33, p.1191-1196, 2000.

KOKKONA M.; KALLINTERI P.; FATOUROS D.; ANTIMISIARIS SG. Stability of SUV liposomes in the presence of cholate salts and pancreatic lipases: effect of lipid composition. **Eur J Pharm Sci**, v.9, n.3, p.242-252, 2000.

KHORRAM-MANESH A.; AHLMAN, A.; JANSSON, S. et al. Adrenocortical carcinoma: surgery and mitotane for treatment and steroid profiles for follow-up. **World J Surg**, n.22, p.605-612, 1998.

KIKUCHI H.; YAMAUCHI H.; HIROTA S. A spray-drying method for mass production of liposomes. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.39, n.6, p.1522-1527, 1991.

KOPF, D.; GORETZKI, P. E.; HENDRIK, L. Clinical Management of malignant adrenal tumors. **J Cancer Res Clin Oncol**, n.127, p.143-455, 2001.

KLOEPFER, A.; QUINTANA, J.B.; REEMTSMA, T. Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples. **Journal of chromatography A**, n.1067, p.153, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA - INMETRO. **DQO-CGCRE-008**: orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, 2003.

JASUS, A.; OEHME, M. Consequences of variable purity of heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)- β -cyclodextrin determined by liquid chromatography-mass spectrometry on the enantioselective separation of polychlorinated compounds. **Journal of Chromatography A**, n.905, p.59-67, 2001.

- KUMI, K.A. Liposome drug products: bioavailability and bioequivalence issues. Office of Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics, Division of Pharmaceutical Evaluation III, 2001. Disponível em http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/slides/3763s2_10_KUMI.PPT. Acesso em 20/07/2008
- LASIC, D. D. Liposomes: From Physics to Applications, Elsevier, Amsterdam, 1993.
- LEVY R.H.; BODDY A.V. Stereoselectivity in pharmacokinetics: a general theory. **Pharmaceutical Research**, v.8, n.5, 1991.
- LIBE R.; FRATTICCI A.; BERTHERAT J. Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. **Endocrine-Related Cancer**, v.14, p.13–28, 2007.
- LIM, M. C.; TAN, Y. O.; CHONG, P. Y. et al. Treatment of adrenal carcinoma with mitotane: outcome and complications. **Ann Acad Med Singapore**, v.19, n.4, p.540-544, 1990.
- LIOU, L.S.; KAY, R. Adrenocortical carcinoma in children. **Pediatr Urol Oncol**, v.27, n.3, p.403-421, 2000.
- LU H. Stereoselectivity in drug metabolism. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v.3, n.2, p.149-158, 2007.
- LUTON, J.P.; CERDAS, S.; BILLAUD, L. et al. Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy. **N Engl J Med**, v.322, n.17, p.1195-1201, 1990.
- MANIRAKIZA P.; COVACI A.; SCHEPENS P. Single Step Clean-Up and GC-MS Quantification of Organochlorine Pesticide Residues in Spice Powder. **Chromatographia**, v.52, n.11/12, 2000.
- MANISHA P.D.; LABHASETWAR V.; AMIDON G.L.; LEVY R.J. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. **Pharmaceutical Research**, v.13, n.12, 1996.
- MARTINEZ M.N., AMIDON G.L.; A Mechanistic Approach to Understanding the Factors Affecting Drug Absorption: A Review of Fundamentals. **J. Clin. Pharmacol.**, v.42; p.620-643, 2002.
- MASSARANI G. Fluidodinâmica em sistemas particulados. Rio de Janeiro: Editora UFRJ, 1997.
- MICHALKIEWICZ, E., SANDRINI, R., FIGUEIREDO, B. et al. Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors. An analysis of 254 cases from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. **J Clin Oncol**, v.22, v.5, p.838-845, 2004.
- MOOLENAR, A.J.; SLOOTEN, H.; VAN SETERS, A. P. *et al.* Blood levels of o,p'DDD following administration in various vehicles after a single dose and during long-term treatment. **Cancer Chemother Pharmacol**, v.7, n.1, p. 51-54, 1981.

NGUYEN X. T.; PABARUE H. A.; GEYER R. R.; SHROYER L. A.; ESTEY L. A.; PARILO M.; WILSON K. S.; PROCHASKA J. Biochemical and biophysical properties of purified phospholipids vesicles containing bovine heart cytochrome c oxidase. **Protein Expression and Purification**, n.26, p.122-130, 2002.

ORLANDO R.M.; CARDOSO FILHO N.; SOUZA GIL E.; STRINGHETTA J.P.S. importância farmacêutica de fármacos quirais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.IV, n.1, p.08-14, 2007. Disponível em http://www.farmacia.ufg.br/revista/_pdf/vol4_1/REF%2008-14.pdf. Acesso em 28/07/2008.

ORTH, D.N.; KOVACS, W.J.; DEBOLD, C.R. The Adrenal Cortex. In: **Williams Textbook of Endocrinology**. 8. ed. W. B. Saunders Company, Pensilvânia, p.489-591, 1992.

PHAN A.T., Adrenal Cortical Carcinoma—Review of Current Knowledge and Treatment Practices. **Hematol Oncol Clin N Am**. N.21, p.489–507, 2007.

PIANOVSKI M.A.; MALUF E.M.; DE CARVALHO D.S.; RIBEIRO R.C.; RODRIGUEZ-GALINDO C.; BOFFETTA P.; ZANCANELLA P.; FIGUEIREDO BC. Mortality rate of adrenocortical tumors in children under 15 years of age in Curitiba, Brazil. **Pediatr Blood Cancer**, v.47, n.1, p.56-60, 2006.

POMMIER, R. F.; BRENNAN, M. F. An eleven-year experience with adrenocortical carcinoma. **Surgery**, v.6, n.112, p. 963-71, 1992.

REKOSKE, J. A., Chiral separation. **AIChE Journal**, v.47, n.1, p.2-5, 2001.

REICHEL C, BRUGGER R, BANG H, GEISSLINGER G, BRUNE K. Molecular cloning and expression of a 2-arylpropionyl-coenzyme A epimerase: A key enzyme in the inversion metabolism of ibuprofen. *Molecular Pharmacology*, v.51, n.4, p. 576-582, 1997.

REIF, V.D.; SINSHEIMER, J E.; WARD, J.C. et al. Aromatic hydroxylation and alkyl oxidation in metabolism of mitotane (o,p'DDD) in humans. **J Pharm Sciences**, v.63, n.11, p.1730-1736, 1974.

REIF, V.D.; SINSHEIMER, J.E. Metabolism of 1-(o-chlorophenyl)-1-(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane (o,p'DDD) in rats. **Drug Metab Dispos**, v.3, n.1, p.15-25, 1975.

REIF, V.D.; SINSHEIMER, J.E. Metabolism of 1-(o-chlorophenyl)-1-(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane (o,p'DDD) in rats. *Drug Metab Dispos*, v.3, n.1, p.15-25, 1975. RIBEIRO, R.C.; FIGUEIREDO, B.C. Childhood adrenocortical tumours. **Eur J Cancer**, v.40, n.8, p.1117-26, 2004.

RIVAS A.; CERRILLO I.; GRANADA A.; MARISCAL-ARCAS M.; OLEA-SERRANO F. Pesticide exposure of two age groups of women and its relationship with their diet. **Science of the Total Environment**. v.382, p.14–2, 2007.

- RODRIGUES V.N.M.; REYES F.G.R.; MAGALHÃES P.M.; RATH S. GC-MS Determination of Organochlorine Pesticides in Medicinal Plants Harvested in Brazil. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.18, n.1, p.135-142, 2007.
- SANDRINI, R.; RIBEIRO, R. C.; DELACERDA, L. Childhood adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, v.82, n.7, p.2027-3, 1997.
- SCHULICK, R. D.; BRENNAN, M. F. Long-term survival after complete resection and repeat resection in patients with adrenocortical carcinoma. **Ann Surg Oncol**, n.6, v.8, 719-726, 1999.
- SCHMIDTT P.H.; GARRISON A.W.; FREITAG D.; KETTRUP A. Application of cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography to the separation of selected neutral pesticides and their enantiomers. **Journal of Chromatography A**, n.792, p.419-429, 1997.
- SCHTEINGART, D.E. Conventional and novel strategies in the treatment of adrenocortical cancer. **Braz J Med Biol Res**, v.10, n.33, p.1197-1200, 2000.
- SHARMA A.; SHARMA U. Liposomes in drug delivery: progress and limitation. **Int. J. Pharm**, v.154, p.123-140, 1997.
- SHEN H.; VIRTANEN H.E.; MAIN K.M.; KALEVA M.; ANDERSSON A.M.; SKAKKEBAEK N.E.; TOPPARI J.; SCHRAMM K.W. Enantiomeric ratios as an indicator of exposure processes for persistent pollutants in human placentas. **Chemosphere**, n.62, v.3, p.390-395, 2006.
- SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, n.552, v.1, 2005.
- STORM G.; CROMMELIN D.J.A. Liposomes: quo vadis? **PSTT**, n.1, p.19-31, 1998.
- TÁRKÁNYI G. Quantitative approach for the screening of cyclodextrins by nuclear magnetic resonance spectroscopy in support of chiral separations in liquid chromatography and capillary electrophoresis Enantioseparation of norgestrel with α , β , γ -cyclodextrins. **Journal of Chromatography A**, v.961, p.257-276, 2002.
- TERZOLO, M; PIA, A.; BERRUTI, A. et al. Low-Dose Monitored Mitotane Treatment Achieves the Therapeutic Range With Manageable Side Effects in Patients with Adrenocortical Cancer. **J Clin Endocrinol Metab**, v.85, n.6, p.2234-2238, 2000.
- TERZOLO M., ALFREDO BERRUTI A. Adjunctive treatment of adrenocortical carcinoma. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity**, n.15, p.21-226, 2008.
- TROTTA M.; GALLARATE M.; PATTARINO F.; MOREL S. Emulsions containing partially water-miscible solvents for the preparation of drug nanosuspensions. **Journal of Controlled Release**, n.76, p.119-128, 2001.
- U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry: Liposome Drug Products:

Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation, 2002. Disponível em <http://www.fda.gov/cder/guidance/2191dft.pdf>. Acesso em 20/07/2008.

VAN DITZHUIJSEN CI, VAN DE WEIJER R, HAAK HR. Adrenocortical carcinoma. **Neth J Med.**, v. 65, n. 2, p. 55-60, 2007.

VAN SLOOTEN, H.; MOOLENAAR, A. J; VAN SETERS, A. P. et al. The Treatment of Adrenocortical Carcinoma with o,p'DDD: Prognostic Implications of Serum Level Monitoring. **Eur J Clin Oncol**, v.20; n.1, p.47-53, 1984.

VILLANOVA J.C.O.; CONSIGLIERI V.O. Aspectos farmacotécnicos dos lipossomas: produção, caracterização e estabilidade. **Rev. Bras. Ciênc. Farm**, v.36, p.179-199, 1999.

WANG J.J.; LU H.; CHAN KK. Stereoselective pharmacokinetics of ifosfamide in male and female rats. **AAPS Pharm Sci**, v.2, n.2, 2000.

WOOTEN, M. D.; KING, D. K. Adrenal cortical carcinoma. Epidemiology and treatment with mitotane and a review of the literature. **Cancer**, v. 72, n.11, p.3145-55, 1993.

YEA KUB A.; COLE R.B. SFE Plus C₁₈ Lipid Cleanup Method for Selective Extraction and GC/MS Quantitation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Biological Tissues, **Anal. Chem.**, n.70, v.15, p.3242 -3248, 1998.

YEOLE R.D.; JADHAV A.S.; PATIL K.R.; RANE V.P.; KUBAL M.L.; SINGH S.; PATEL M.V.; KHORAKIWALA H.F. Validated chiral high-performance liquid chromatography method for a novel anti-methicillin-resistant staphylococcus aureus fluoroquinolone WCK 771. **Journal of Chromatography A**, n.1108, p.38-42, 2006.

YU, L.X.; AMIDON G.L.; POLLI J.E.; ZHAO H.; MEHTA M.U., CONNER D.P., SHAH V.P.; LESKO L.J., CHEN M.L.; LEE V.H.L., HUSSAIN A.S. Biopharmaceutics Classification System: The Scientific Basis for Biowaiver Extensions. **Pharmaceutical Research**, v.19, n.7, 2002.

WESTOVER E.J.; LIN X.; RIEHL T.E.; MA L.; STENSON W.F.; COVEY D.F.; OSTLUND RE J.R. Rapid transient absorption and biliary secretion of enantiomeric cholesterol in hamsters. **J Lipid Res.**, n.47, v.11, p.2374-81, 2006.

WIBERG, K.; HARNER, T.; WIDEMAN, J. L.; BIDLEMAN, T. F. Chiral analysis of organochlorine pesticides in Alabama soils. **Chemosphere**, n.45, p.843-848, 2001.

ZANCANELLA P.; PIANOVSKI M.A.; OLIVEIRA B.H.; FERMAN S.; CUSTÓDIO G.; PARISE G.A.; SANTANA M.H.A.; FIGUEIREDO B.C. Mitotane Associated With Cisplatin, Etoposide and Doxorubicin in Advanced Childhood Adrenocortical Carcinoma: Mitotane Monitoring and Tumor Regression. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, n.28, v.8, p.513-24, 2006.

8 Anexos

- ANEXO 7.1 CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM
SERES HUMANOS DO HOSPITAL ERASTO GAERTNER, LIGA PARANAENSE DE
COMBATE AO CÂNCER
- ANEXO 7.2 CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA E
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DO SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UFPR

8.1 CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO HOSPITAL ERASTO GAERTNER, LIGA PARANAENSE DE COMBATE AO CÂNCER



PARECER CONSUBSTANCIADO

No dia 10 de junho de 2008, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Erasto Gaertner avaliou o projeto intitulado como: "Mitotano: Estudo da composição Enantiomérica em Plasma de Pacientes Pediátricos e Encapsulação em Lipossomas seguido de Investigação de Alterações Farmacocinéticas", P.P. nº 1656 cuja pesquisadora principal, Farm. Patrícia Zancanella tendo o seguinte parecer:

OBJETIVOS: Investigar se há diferenças na metabolização dos isômeros R e S, através da determinação da sua proporção no plasma de pacientes pediátricos acometidos por CAC..

SUMÁRIO DO PROJETO: Amostras de plasma de 14 pacientes pediátricos com carcinoma de adrenal estágio III e IV, tratados com mitotano e obtidas entre 2003 e 2004, serão utilizadas para investigação da composição enantiomérica do mitotano. Tais amostras serão quantitativamente analisadas utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência equipada com uma coluna quiral (γ-ciclodextrina).

Será utilizado o método ANOVA para determinar se as concentrações dos enantiômeros R e S no plasma dos pacientes são diferentes entre si.

CONSIDERAÇÕES:

a) Projeto sem restrições.

PARECER: APROVADO

Membros do CEP:

Ana Paula Hey – Enfermeira
Andréa Wulf Pereira de Melo Tratch – Enfermeira
Angeli Visentin – Enfermeira
Ariovaldo Donizetti de Abreu – Fisioterapeuta
Clarice Nana Yamanouchi – Médica
Daniel Cury Ogata – Médico
Edenice de Oliveira Santana – Enfermeira
Fabricio Augusto Martinelli de Oliveira – Médico
Francisco José Koller – Enfermeiro

Cyrl Henrique Albrecht Ramos – Médico
Iolanda de Assis Galvão – Psicóloga
Jordan Zanetti Silva – Médico e Advogado
Jose Carlos Wiederkehr – Administrador de Empresas
Luiz Antonio Negrão Dias – Médico
Márcia Bobak – Enfermeira
Mônica de Fátima Maciel da Rosa – Nutricionista
Paola Andréa Galbiatti Pedruzzi – Médica
Wanda Aparecida Silva – Representante da Comunidade

8.2 CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DO SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UFPR



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEa)



CERTIFICADO N.º 268

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEa) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA N.º 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEa, estabelecidas pela RESOLUÇÃO N.º 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, e considerando o contido no Regimento Interno do CEEa, **CERTIFICA** que os procedimentos que utilizam animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

APROVADO.

PROCESSO: 23075.033562/2007-46

RO 08/2007 - 01/10/2007

TÍTULO: Mitotano: encapsulação em lipossomas seguido de investigação de alterações farmacocinéticas utilizando modelos animais

AUTORES: Brás Heleno de Oliveira, Patricia Zancanella, Bonald Cavalcanti Figueiredo, Patricia Severino, Maria Helena Andrade Santana, César Costapinto Santana

DEPARTAMENTO: Química

Curitiba, 15 de outubro de 2007.

Profª. Ana Maria Caliman Filadelfi
Coordenadora do CEEa